

(19) **Republic of Germany**
German Patent Office

(51) Not given

(12) **DECLARATION**(11) **DE 32 21 681 A1**

(21) File No.: P32 21 681 5
 (22) Date of Application June 8, 1982
 (43) Date of Declaration December 8, 1983

(71) Applicant: Bayer AG. 5090 Leverkusen, DE Leybod-Heraeus, GmbH 5000 Köln, DE	(72) Inventor(s) Bennington, Alfred, Prof. Dr., 4400 Münster, DE Kämpf, Günther, Prof. Dr., 4150 Krefeld, DE Holm, Reimer, Dr., 5060 Bergisch-Gladbach DE Heinen, Hans Joseph, Dr. Meier, Stefan, 5000 Köln
(74) Patent Attorney(s): None stated	(56) Research documentation Per § 43 Abs. 1 PatG None Stated

(54) Title: "Mass spectrometer with
 external sample mounting"

Summary

In the use of a mass spectrometer, the sample to be investigated must be vaporized and ionized, in order to achieve a mass separation with the aid of electrical or magnetic fields. For the gasification and ionization of the sample, a laser impulse is employed.

In the present invention, the sample is no longer in the mass spectrometer, but is affixed to a thin polymer membrane and placed externally to the mass spectrometer in air or is enveloped by a protective gas. When this is done, the polymer membrane is designed as an entry window for the mass spectrometer space. By means of the laserbeam, a micro-hole is burned in the carrier membrane, by means of which the sample, which is to be found at this location, is vaporized. The diameter of the micro-hole is so small, that the high vacuum of the mass spectrometer is not affected. This invention enables the mass spectrometric investigation of solid particulate samples, which, in a vacuum would dissociate or be lost by volatility. In this way, new application fields open for mass spectrography.

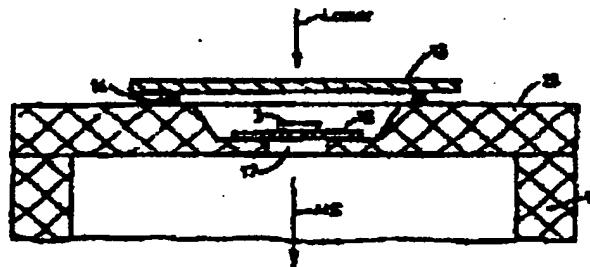


FIG. 2

CLAIMS

Claimed is:

- 1) A mass spectrometer (1) with a laser (2) for the vaporization and ionization of the sample to be investigated, therein characterized, in that the sample, affixed externally to the mass spectrometer (1) onto a thin polymer membrane (3), is placed under the pressure of the atmosphere or a protective gas and the said polymer membrane serves as an entry window to the mass spectrometer space.
- 2) A mass spectrometer in accord with Claim 1, therein characterized, in that the polymer carrier membrane (3) is mechanically stabilized by means of a lattice, screen, or by a single or multiple hole orifice (16).
- 3) A mass spectrometer in accord with Claim 1 or 2, therein characterized, in that on the carrier membrane (3), a multiplicity of samples (24) is placed in matrix formation with the aid of a rasterized table which is adjustable relative to the laser beam.
- 4) A mass spectrometer in accord especially with Claim 3, therein characterized, in that the intrinsically hydrophobic carrier membrane (3), by means of specifically located hydrophilic areas obtains a surface pattern corresponding to the sample matrix and the said samples (24) are deposited on the carrier membrane (3), by a wetting of the hydrophilic areas with a solution of the respective sample or suspension.
- 5) A mass spectrometer in accord with Claims 1 to 4, therein characterized, in that the ions, formed by the laser flash and which migrate into the spectrometer space, are seized by an attraction field and postaccelerated.

- 6) A mass spectrometer in accord with Claims 1 to 5, therein characterized, in that the mass spectrometer contains an additional source of ions for the post-ionization of the vaporized sample.
- 7) A mass spectrometer in accord with Claims 1 to 6, therein characterized, in that the mass spectrometer is a time-of-flight (TOF) spectrometer.

DESCRIPTION

A mass spectrometer with external sample mounting

[German page No. 3]

Mass spectrometers have become today an indispensable tool in industry and research. By the introduction of protective methods of ionization, success has come in increasing measure in extending mass spectrometry for the identification and affirmation of complicated organic compounds. Thus, new applications have arisen in the pharmaceutical and plant protection sectors as well as recently also in biomedicinal research.

In all mass spectrometric analysis, where solid materials were involved, up to this time the sample to be investigated had to be brought by an appropriate object carrier into an evacuated mass spectrometer space. As a rule, this involved a substantial amount of time, since the mass spectrometer had to be opened and subsequently re-evacuated. In the case of acceleration apparatuses, it is true that an automation is achieved and the time of preparation substantially shortened. These apparatuses, however, have the disadvantage that they are, equipment-wise, expensive and in general, difficult to manipulate.

[German page No. 4]

Very frequently, solid body samples contain not only substances slow to volatilize, but also substances of high volatility (vacuum sensitive materials). The latter vaporize so quickly in the mass spectrometer space, that up to the instant of the analysis, the composition of the sample has changed. The mass spectroscopical results then lead to false results.

A further disadvantage of the conventional mass spectrometry on solid bodies lies therein, in that traces of slowly volatizing components deposit at other locations in the mass spectrometer space and upon subsequent measurements, appear as background (memory effect). The easily vaporized components are less of a problem in this regard, since, upon reheating of the apparatus, in case of need, they can be pumped out.

In recent time, mass spectrometers have been developed, by which the sample is vaporized and ionized within the spectrometer space by a laser discharge. The ions so formed are then identified with the help of a time-of-flight (TOF) spectrometer. Such mass spectrometers possess a high transmission, a high spatial resolving power and, because of the protecting ionization, these are particularly suited for detection of thermally unstable organic components. In particular, with such equipment, it is now possible for the first time to investigate biological samples with high spatial resolution capabilities (human or animal tissues). Refer to, for instance, Kaufmann et al., European

[German page No. 5]

Spectroscopy News 20 (1978), pages 41 - 43). Particularly here, post mortem changes and drying artifacts present an essential diminution of the possibilities for application.

Up to now, there were no opening points by which one could meet the above described disadvantages and difficulties which were transferred into mass spectrometry.

The present invention

This is the initiation point for the present invention. The setting of the goal included the creation of a mass spectrometer, utilizing laser desorption, with which vacuum sensitive substances could be better investigated.

In accord with the present invention, the above described problems can be solved, in that a sample affixed to a thin polyester membrane is placed, not as previously in the internal mass spectrometer space, but externally to the spectrometer under atmospheric or protective gas pressure. In this way, the thin polymer membrane is designed as an entry window to the mass spectrometer space. It has been surprisingly discovered, that the thin polymer carrier membrane (thickness ca. 3.1 μm) can serve as a separation membrane between the atmosphere and the mass spectrometer (high vacuum). Further, this carrier membrane does not deteriorate, even by a plurality of penetrations by the laser.

[German page No. 6]

In a practical way, the polymer carrier membrane is reinforced by a lattice, screen, or by a single or multiple hole orifice and thereby mechanically stabilized.

A further development in connection with the invention is found therein, that on the carrier membrane a plurality of samples are placed in the manner of a matrix, and the membrane, with the aid of a rasterized table, is adjustable to conform to the laser beam. Advantageously, such a sample matrix is realized, in that the intrinsically hydrophobic carrier membrane, by means of specifically located hydrophilic areas obtains a surface pattern corresponding to the sample matrix and the said samples are deposited on the carrier membrane by a wetting of the hydrophilic areas with a solution of the respective samples or suspensions.

As to further improvements and advantageous embodiments of the mass spectrometer, reference is made to the subordinate Claims.

The following advantages are attained by the invention:

- a) Solid material samples, which are composed of volatile as well as slowly volatile components, for instance, polymers with volatile additives were, in mass spectrometrical analysis, not exposed to the vacuum, but were retained for investigation under atmospheric pressure or the pressure of a protective gas. By the present invention, changes in the samples can be widely eliminated.

[German page No. 7]

- b) The possibility exists, by the use of drying and vacuum, to investigate aqueous, thin film or cellular smears from biologic samples without structure changing stresses (artifacts).
- c) Contamination by slowly volatizing components and decomposition products is practically eliminated — no memory effect.
- d) The preparatory time between the removal of a sample and the taking of the mass spectrum, (run-over time) can be essentially shortened since the otherwise necessary funneling of the samples into the mass spectrometer has been eliminated. The manipulation and preparation of the samples is substantially eased.
- e) The holding of the samples externally to the mass spectrometer is, as far as equipment is concerned, greatly simplified and allows a high degree of automation at a relatively small expense.

Thus, with the present invention, new application areas in mass spectrometry are opened, for instance in the field of polymers, biology and medicine. As to the latter, the procedure is now, as before, an in-vitro analysis, which however, comes significantly closer to an in-vivo examination. Up to now, the locality resolution of the conventional micro-mass analyzers with laser excitation in the case of such samples was highly unsatisfactory, because where the previously necessary preparation of the

[German page No. 8]

biological samples was concerned, a drying and a therewith connected migration of the components to be detected occurred so that a spatial correlation of the identified components was no longer possible. Using the new technology, the detecting power of the point analysis for the identification of the localized position of a component in the biological sample, such as in a cell, is significantly improved.

In the following, embodiment examples of the invention, with reference to drawings, will be examined more closely. There is shown in:

- Fig. 1 a schematic diagram of the construction of a micro-mass spectrometer with laser excitation,
- Fig. 2 the conventional type of sample holding in an apparatus in accord with Fig. 1,
- Fig. 3 the new sample holder in profile section,
- Fig. 4 a plan view of the new sample holder,
- Fig. 5 a preferred embodiment of the new sample holder for automated analysis of a plurality of sampled presented in a profile section and
- Fig. 6 the sample holder of Fig. 5 shown in plan view.

The micro-mass analyzer, which is schematically rendered in Fig. 1 and equipped with a laser, is comprised essentially of a TOF-mass spectrometer 1 and a pulsed, high duty laser 2 for the vaporization and ionization of a sample on object carrier 3.

[German page No. 9]

The laser beam, by means of a semireflecting mirror 4, with the help of an objective, is focused on the sample. With an ocular 6, the positioning of the sample in the mass spectrometer space, relative to the laser beam can be visually controlled, and upon requirement, can be post adjusted.

The laser 2 produces a very short light impulse (laser flash), which vaporizes the sample on the object carrier 3, and, for the most part, also ionizes it. The ions so formed are seized by the TOF massspectrometer, separated in accord with the principle of running time and then meet again after one another on the detector. A multiplier 7 is used as a detector, which produces an electrical impulse sequence corresponding to the impacting ionized components. The impulse sequence, after amplification 8, are directed to a transient receiver 9 and subsequently plotted on a graphic recorder 10 and an oscillograph 11. The transient receiver 9 is triggered by the laser 2. The vacuum necessary for the operation of the TOF mass spectrometer is generated by conventional vacuum pumps (connection fitting 12 shown). At the entry of the mass spectrometer 1, in a practical way, an electrical lens (ion lens) is installed. This produces an attraction field with which the ions generated by the laser flash are caught and post accelerated.

In the case of conventional apparatuses, a thin carrier membrane serves as object carrier for the sample, which is installed in the high vacuum of the mass spectrometer.

[German page No. 10]

Turning to Fig. 2, the sealing for the high vacuum is shown to be accomplished by a glass plate 13 which lies across a gasketing ring 14 on the outer wall 15 of the mass spectrometer 1. The sample itself is placed on a polymer carrying membrane 3, which itself rests on a sample support 16. The sample support 16 is located in high vacuum and is installed above a central cut-out 17 in the outer wall 15 of the mass spectrometer. The laser beam is focused through the glass plate 13 (entry window) onto the carrier membrane 3 with the thereupon located sample.

Experience has shown, that the thin polymer carrier membrane (thickness, ca. 0.1 μm) can serve directly as a separating means between the atmosphere and the high vacuum of the mass spectrometer. Further, this membrane does not fissure or tear even by multiple holes by the laser. At the same time, it was discovered that the high vacuum necessary for the mass spectrometer is not affected even by a plurality of such holes (diameter ca 2 μm). This fact made it possible, that the carrier membrane 3, with the sample on the outside of the mass spectrometer is subjected to the pressure of the atmosphere or a protective gas. The laser flash then brings about a situation in which the sample on the membrane is vaporized and moves into the mass spectrograph space through a simultaneously occurring hole in the membrane.

In Fig. 3 a corresponding, modified sample holding device is shown in section and in Fig. 4 a plan view of the same is depicted. The carrier membrane location here
[German page No. 11]

corresponds with that of Fig. 2, being on the sample supporter 16, which is still on the side of the atmosphere above the cut-out 17 on the mass spectrometer 1. Sealing of the mass spectrometer is effected by means of the gasketing ring 14, which now lies between the sample support 16 and the outer wall 15 of the mass spectrometer. The carrier membrane 3 forms, with this arrangement, the entry window into the mass spectrometer.

As a sample support 16, orifices may be employed, as, for instance, are common in electron spectroscopy. In that case, massive metal plates are involved, for instance of platinum, silver, steel, among others, these having a thickness of ca. 1 mm and possessing one or more borings 18 with diameters between 20 and 100 μm . The metal plate can also be provided centrally with a larger boring with a metallic net with interstices between 20 and 100 μm . The thin membrane is stretched over this metal orifice arrangement, which membrane serves as a vacuum seal on the one hand and on the other as object carrier for the substance under investigation. By means of the metal orifice (being an orifice of one or more openings, or, so to speak, a screen or a lattice), the carrier membrane is stabilized.

The carrier membrane 3 is comprised, for instance of collodium lacquer, or zapon lacquer [*pyroxylin and amyl acetate*], or yet from Formvar. These materials are also used in electron microscopy. The placing of the carrier membrane 3 on the sample holder 16 is done by allowing the subsidence of a very thin membrane made by spreading out

[German page No. 12]

collodium lacquer, or zapon lacquer or Formvar on a water surface. That is, for instance, carried out in a separating funnel or by producing the carrier membrane by spreading the lacquer on a smooth base, for instance, a glass plate. The removal of the membrane is effected by slow immersion in water. Subsequently, the carrier membrane 3 is transferred to the sample carrier 16.

The proof of the surprising high vacuum holding properties of the carrier membrane, even when penetrated by a plurality of holes from the laser beam, can be brought forth by electron microscopic photographs. In this way, it is demonstrated that the laser beam melts nearly circular holes with a diameter of from 1 to 2 μm in the 0.1 μm thickness carrier membrane. By means of systematic investigations, it can be determined that the operational readiness of the apparatus is maintained, even after a plurality of laser penetrations has taken place. The leaks, because of the said penetrations, are obviously so small, that the vacuum in the apparatus does not deteriorate. Further, the possibility also exists, that after a laser penetration, the hole which is caused in the carrier membrane 3 is immediately closed by a bridging over of the lacquer (for instance, collodium lacquer).

A preferred embodiment of the sample holder for automatic investigation of a plurality of samples is shown in Fig. 5 (profile view) and in Fig. 6 (plan view).

[German page No. 13]

The sample holder 16 in this case, is a rectangular plate with, for instance, $5 \times 5 = 25$ single hole borings 19, each with a diameter of 50 μm . Congruent to this multiple hole orifice plate, a plurality of various samples are point-wise applied to the carrier membrane in the manner of a matrix. The sample holder 16 in this case, is a component part of a slidable rasterized table movable in two directions, i.e. "x" and "y".

The rasterized table, with the aid of step motors 20 and 23, can be positioned as desired in the "xy" plane. On the side opposite the motors, the rasterized table is provided with retraction springs. The motors 20 and 21 are moreover connected to a programming control, which allows that the single samples 24, are brought, one after the other, into the optical axis, i.e. the position of the laser beam.. The sample 24, centered on the laser beam's impact point, is now vaporized by a laser flash and in part, ionized. The ionized vapor now passes through the micro opening made in the carrier membrane as well as through the coinciding boring 19 in the mass spectrometer space. A cloud of ions is, at this point, seized by an electrical lens and guided to the following TOF-mass spectrometer, where a separation in accord with the mass/charge ratio takes place and the intensities of the molecular peaks are graphically recorded. In principle, any mass spectrometer can be employed that permits a simultaneous display of the mass spectrum. TOF-mass spectrometers fill this requirement and have proven themselves in service, because they possess a high degree of transmission ability.

[German page No. 14]

For a case, in which the ionization of the sample through the laser flash does not suffice, at the entry 17 of the mass spectrometer space, a further source of ions is installed for the post ionization of the vaporized sample.

The entire run of the analysis of the $5 \times 5 = 25$ single samples is carried out fully automatically by the coupled programmed control of the step motors 20 and 21. In particular, the intensity of the molecular peaks associated with each individual analysis can be collated in a subsequently attached computer. Up to this time, such a highly automatized procedure of this nature could not be attained by mass spectrometers of similar construction.

Difficulties arise first, in the deposition of the substance to be analyzed onto small, preselected surfaces, for instance, in circles of 10 to 50 μm , on the carrier membrane. This problem, however, can be overcome in that the intrinsically hydrophobic polymer carrier membrane is, in a localized manner, made hydrophilic by radiation with appropriately bundled rays of electrons or ions.

Also, a localized, corresponding, hydrophilic pattern can be made through treatment in a gas discharge stream driven by direct or alternating electrical current with the interposing of corresponding orifices having circular openings of appropriate size. In this way, the substances to be investigated can be, with point to point exactness, deposited out of a polar, particularly aqueous solution or suspension while the order of the above described matrix is not disturbed.

[German page No. 15]

This preparation activity can be universally employed, when the task presented is to examine by mass spectrometer means, dissolved substances which are to be crystallized out on very small surfaces on the object carrier or substances precipitated from a suspension by means of drying the liquid phase. By means of the concentration of the sample on a narrowly limited surface, it is possible to increase the layer thickness of the substance to be investigated and at the same time to raise the sensitivity of the procedure. This advance in technology can also be put to use for other processes of solid body mass spectrometry, such as, for instance, secondary ion mass spectrometry.

There are also application possibilities which can be used, where the mass spectrometer is only employed for the analysis of a plurality of samples, to determine whether a certain component is present or not, or, again, in order to carry out systematic concentration requirements for one component. In such cases, the mass spectrometer is adjusted for the specific mass which is to be detected. In the case of these investigations, the new sample holding means can be combined in connection with the laser, even with conventional mass spectrometers, for instance Quadrupol-Mass Spectrometers. The laser then serves only the purpose of transporting the externally mounted sample into the mass spectrometer space, that is, to move it into the ion source.

The transport is then based, on the one hand upon the laser flash, and on the other on the inflow of the sample into the vacuum through the opening burned in the carrier membrane by the laser.

[This completes the translation of DE 32 21 681]

Nummer 3221681
Int. Cl. 3: H01J 49/04
Anmeldetag: 8. Juni 1982
Offenlegungstag: 8. Dezember 1983

1/4

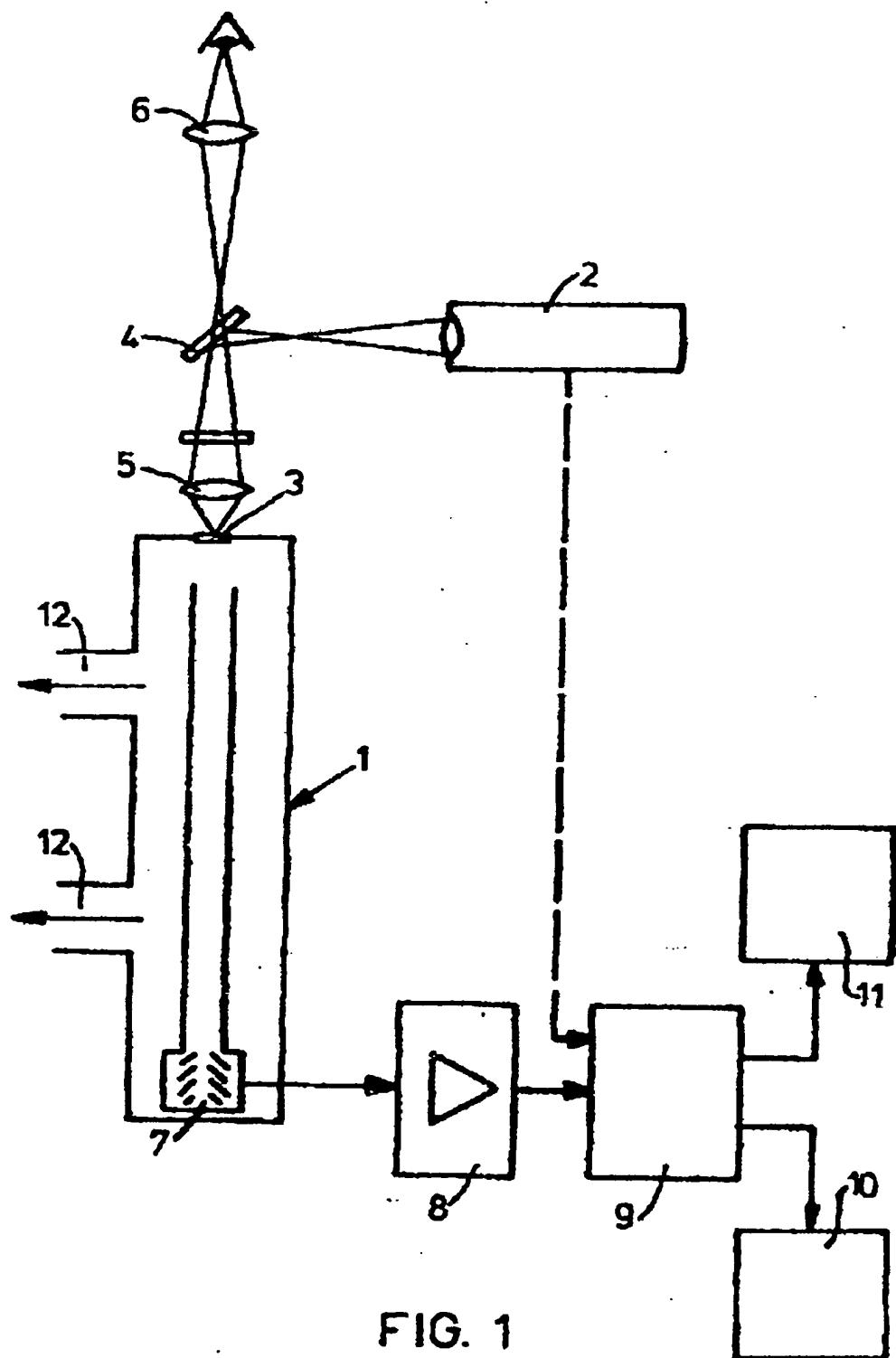


FIG. 1

3221681

2/4

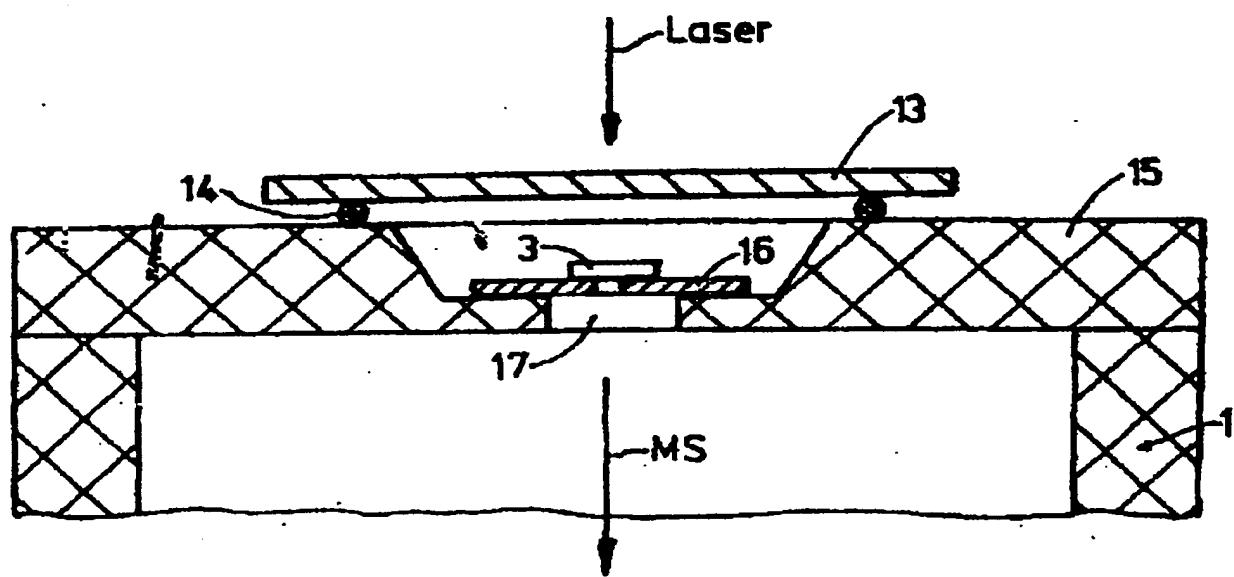


FIG. 2

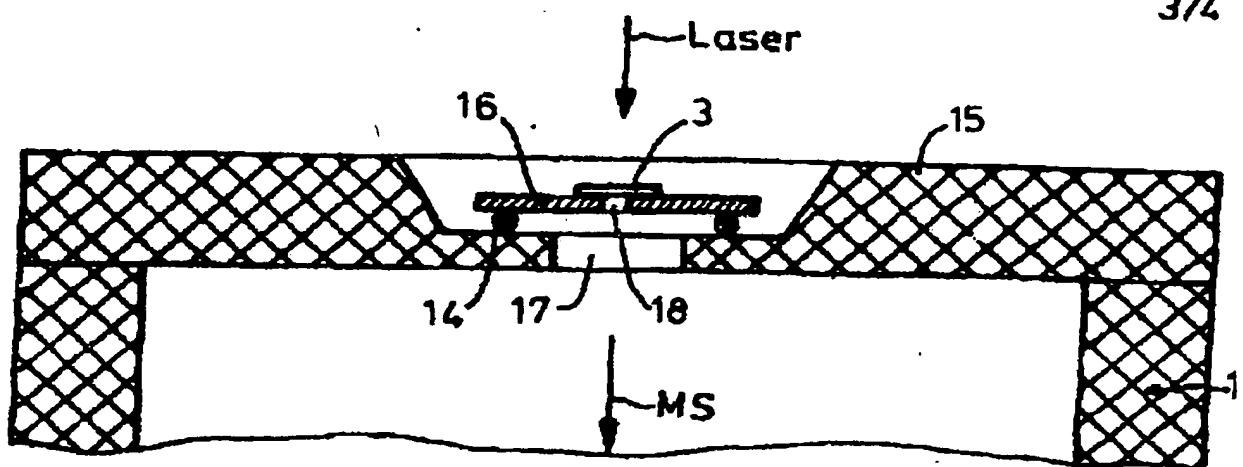


FIG. 3

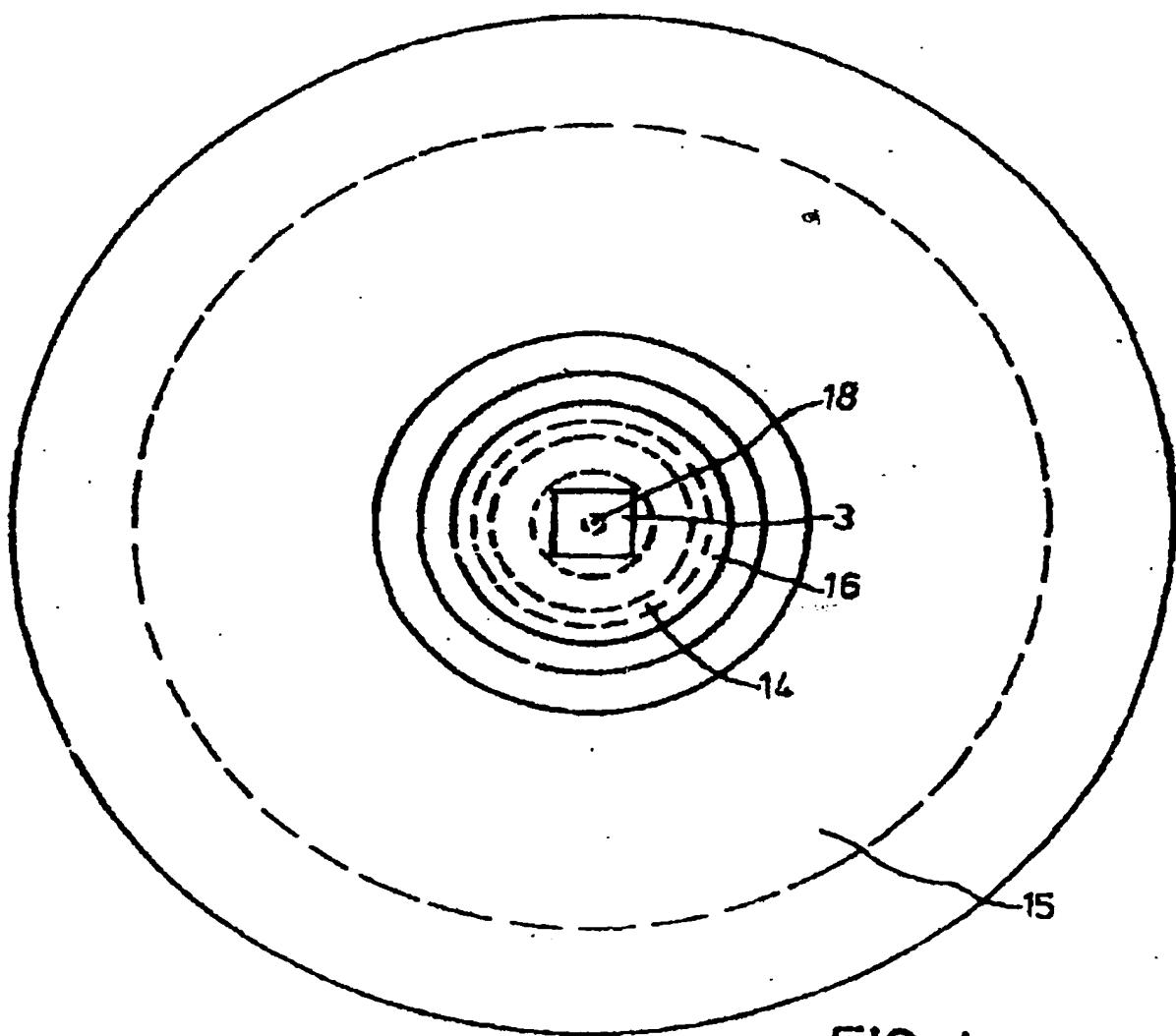


FIG. 4

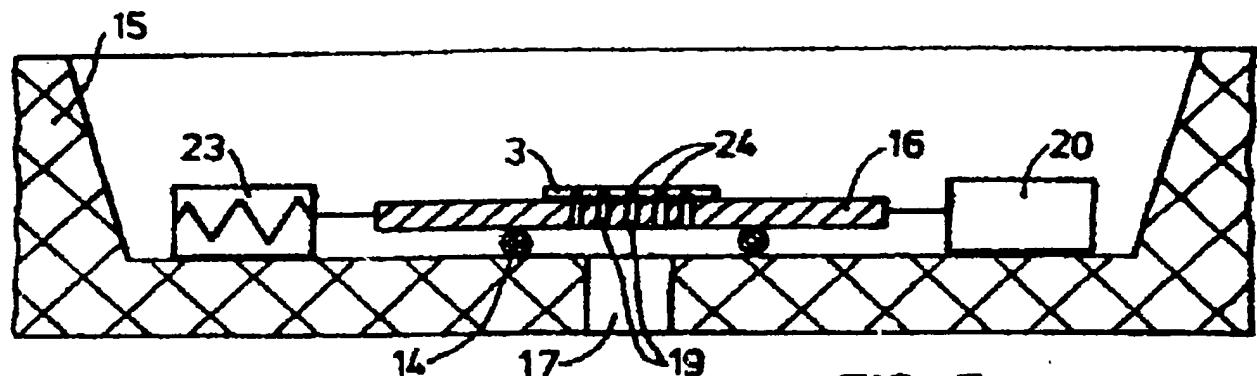


FIG. 5

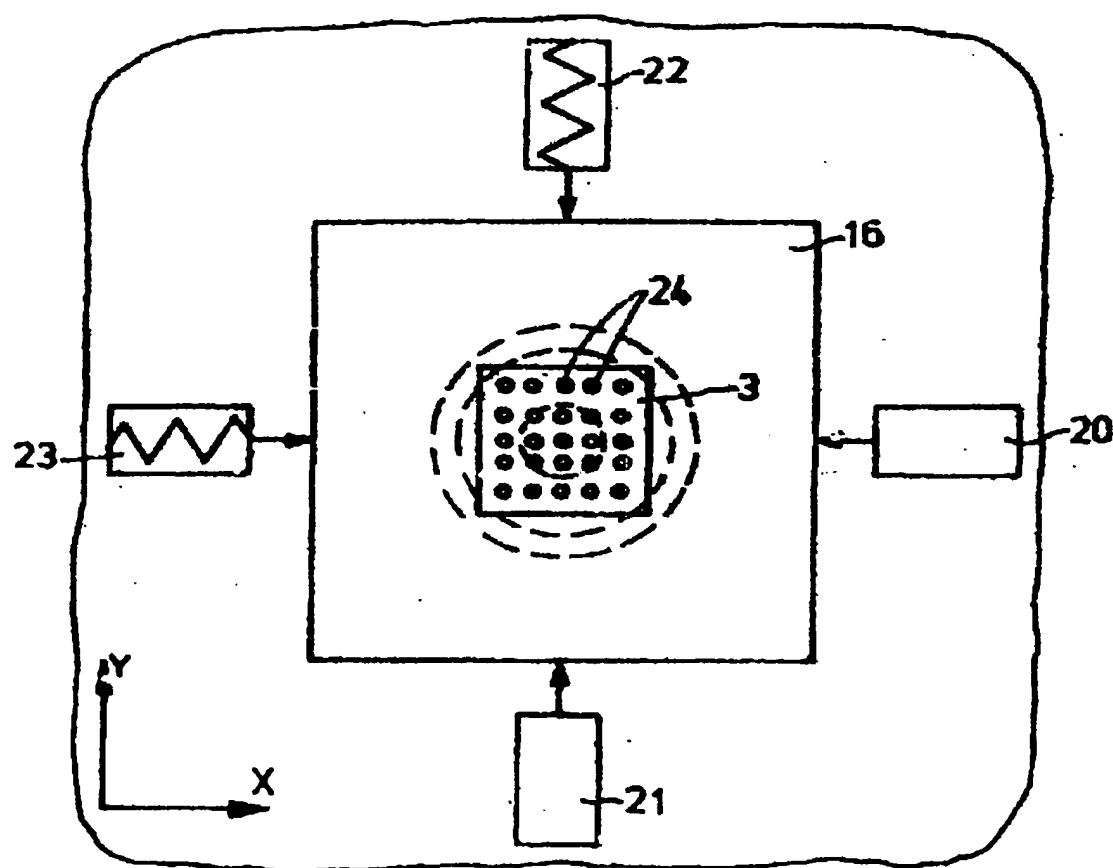


FIG. 6



⑪ Aktenzeichen: P 32 21 681.5
⑪ Anmeldetag: 8. 6. 82
⑪ Offenlegungstag: 8. 12. 83

① Anmelder:

Bayer AG, 5090 Leverkusen, DE; Leybold-Heraeus
GmbH, 5000 Köln, DE

① Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

② Erfinder:

Benninghoven, Alfred, Prof. Dr., 4400 Münster, DE;
Kämpf, Günther, Prof. Dr., 4150 Krefeld, DE; Holm,
Reimer, Dr., 5060 Bergisch-Gladbach, DE; Heinen,
Hans Josef, Dr.; Meier, Stefan, 5000 Köln, DE

④ Massenspektrometer mit externer Probenhalterung

Im Massenspektrometer muß die zu untersuchende Probe verdampft und ionisiert werden, um eine Massentrennung mit Hilfe von elektrischen und/oder magnetischen Feldern zu erreichen. Zur Verdampfung und Ionisierung der Probe wird ein Laser-Impuls benutzt. Die Probe befindet sich nicht mehr wie bisher im Massenspektrometer, sondern ist auf einer dünnen Polymerfolie fixiert und auf der Außenseite des Massenspektrometers unter Normaldruck (Luft oder Schutzgas) angeordnet. Die Polymerfolie ist dabei als Eintrittsfenster zum Massenspektrometerraum ausgebildet. Durch den Laserstrahl wird ein Mikroloch in die Trägerfolie gebrannt, durch das die an dieser Stelle befindliche Probe in den Massenspektrometerraum verdampft. Der Durchmesser des Mikroloches ist so klein, daß das Hochvakuum im Massenspektrometer nicht beeinträchtigt wird. Die Erfindung ermöglicht die massenspektrometrische Untersuchung von Festkörperproben, die sich im Vakuum zersetzen oder verflüchtigen würden. Dadurch können der Massenspektrometrie neue Anwendungsgebiete erschlossen werden. (3221681)

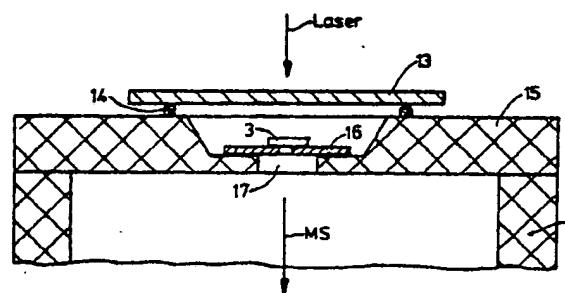


FIG. 2

Patentansprüche

1) Massenspektrometer (1) mit einem Laser (2) zur Verdampfung und Ionisierung der zu untersuchenden Probe, dadurch gekennzeichnet, daß die auf einer dünnen Polymerfolie (3) fixierte Probe auf der Außenseite des Massenspektrometers (1) unter Atmosphärendruck oder Schutzgas angeordnet ist und die Polymerfolie (3) als Eintrittsfenster zum Massenspektrometerraum ausgebildet ist.

5 10 2) Massenspektrometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die polymere Trägerfolie (3) durch ein Netz bzw. Gitter oder durch eine Ein- oder Mehrlochblende (16) mechanisch stabilisiert ist.

15 3) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Trägerfolie (3) nach Art einer Matrix eine Vielzahl von Proben (24) angeordnet ist und die Trägerfolie (3) mit Hilfe eines Kreuztisches relativ zum Laserstrahl justierbar ist.

20 4) Massenspektrometer insbesondere nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die an sich hydrophobe Trägerfolie (3) durch örtliche Hydrophilierung ein der Probenmatrix entsprechendes Flächenmuster enthält und die Proben (24) durch Benetzung der hydrophilierten Bereiche mit einer die jeweilige Probe enthaltenden Lösung oder Suspension auf der Trägerfolie (3) abgeschieden sind.

25

- 5) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die durch den Laserblitz gebildeten und in den Massenspektrometerraum gelangten Ionen durch ein Ziehfeld erfaßt und nachbeschleunigt werden.
- 6) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Massenspektrometer eine zusätzliche Ionenquelle zur Nachionisierung der verdampften Probe enthält.
- 10 7) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Massenspektrometer ein Flugzeitspektrometer ist.

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

5090 Leverkusen, Bayerwerk

Zentralbereich

Patente, Marken und Lizenzen Ki/bc/c

7. Juni 1982

Massenspektrometer mit externer Probenhalterung

Massenspektrometer sind heute zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel in Industrie und Forschung geworden. Durch Anwendung schonender Ionisierungsmethoden gelingt es auch in zunehmendem Maße, die Massenspektrometrie auf die Identifizierung und den Nachweis von komplizierten organischen Verbindungen auszudehnen. Dadurch ergeben sich neue Anwendungen auf dem Pharma- und Pflanzenschutzsektor sowie neuerdings auch in der biomedizinischen Forschung.

10 Bei allen massenspektrometrischen Untersuchungen an Festkörpern muß bisher die zu untersuchende Probe auf einem geeigneten Objektträger in den evakuierten Massenspektrometerraum gebracht werden. Dies ist in der Regel mit erheblichem Zeitaufwand verbunden, da das

15 Massenspektrometer geöffnet und anschließend wieder evakuiert werden muß. Bei Schleusenvorrichtungen kann zwar eine Automatisierung erreicht werden und die Vorbereitungszeit wesentlich verkürzt werden. Sie haben jedoch den Nachteil, daß sie apparativ aufwendig

20 und im allgemeinen schwierig zu handhaben sind.

Häufig enthalten Festkörperproben neben schwer flüchtigen auch leicht flüchtige Komponenten. Letztere verflüchtigen sich u.U. so schnell im Massenspektrometerraum, daß zum Zeitpunkt der Analyse die Zusammensetzung der Probe verändert ist. Die massenspektrometrische Analyse führt dann zu falschen Ergebnissen (vakuumempfindliche Substanzen).

Ein weiterer Nachteil der konventionellen Festkörpermassenspektrometrie liegt darin, daß sich Spuren von schwerflüchtigen Komponenten an anderen Stellen im Massenspektrometerraum niederschlagen und bei nachfolgenden Messungen als Untergrund in Erscheinung treten können (Memory Effekt). Die leicht flüchtigen Komponenten sind in dieser Hinsicht weniger problematisch, da sie gegebenenfalls bei gleichzeitigem Ausheizen der Apparatur abgepumpt werden.

In neuerer Zeit sind Massenspektrometer entwickelt worden, bei denen die Probe im Massenspektrometerraum durch einen Laserblitz verdampft und ionisiert wird. Die gebildeten Ionen werden mit Hilfe eines Flugzeitspektrometers identifiziert. Solche Massenspektrometer besitzen eine hohe Transmission, eine hohe räumliche Auflösung und sind wegen der schonenden Ionisierung auch zum Nachweis von thermisch labilen organischen Komponenten geeignet. Insbesondere konnten damit zum ersten Mal biologische Proben mit hohem räumlichen Auflösungsvermögen (menschliches oder tierisches Gewebe) untersucht werden (s. z.B. R. Kaufmann et al., European

Spectroscopy News 20 (1978), Seite 41-43). Gerade hier stellen bisher postmortale Veränderungen und Trocknungsartefakte eine wesentliche Einschränkung der Anwendungsmöglichkeiten dar.

5 Bisher gibt es noch keine Ansatzpunkte, wie man den oben beschriebenen, mit der Überführung ins Massenspektrometer verbundenen Nachteilen und Schwierigkeiten begegnen kann.

10 Hier setzt die Erfindung an. Es bestand die Zielsetzung, unter Ausnutzung der Laserdesorption ein Massenspektrometer zu schaffen, mit dem auch vakuumempfindliche Substanzen besser untersucht werden können.

15 Erfindungsgemäß können die oben beschriebenen Probleme dadurch gelöst werden, daß die auf einer dünnen Polymerfolie fixierte Probe nicht wie bisher in den Massenspektrometerraum eingebracht wird sondern auf der Außenseite des Massenspektrometers unter Atmosphärendruck oder Schutzgas angeordnet ist, wobei die Polymerfolie 20 als Eintrittsfenster zum Massenspektrometerraum ausgebildet ist. Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die dünne polymere Trägerfolie (Dicke ca. 0,1µm) direkt 25 als Trennfolie zwischen der Atmosphäre und dem Massenspektrometer (Hochvakuum) dienen kann und diese Trägerfolie auch bei mehrmaligem Durchschuß mit dem Laser nicht aufreißt.

Zweckmäßig ist die polymere Trägerfolie durch ein Netz bzw. Gitter oder durch eine Ein- oder Mehrlochblende abgestützt und mechanisch stabilisiert.

Eine Weiterentwicklung im Zusammenhang mit der Erfindung besteht darin, daß auf der Trägerfolie nach Art einer Matrix eine Vielzahl von Proben angeordnet ist und die Folie mit Hilfe eines Kreuztisches relativ zum Laserstrahl justierbar ist. Vorteilhaft wird eine solche Probenmatrix dadurch realisiert, daß die an sich hydrophobe Trägerfolie durch örtliche Hydrophilierung ein der Probenmatrix entsprechendes Flächenmuster enthält und die Proben durch Benetzung der hydrophilierten Bereiche mit einer die jeweilige Probe enthaltenden Lösung oder Suspension auf der Trägerfolie abgeschieden sind.

Bezüglich weiterer Verbesserungen und bevorzugter Ausführungsformen des Massenspektrometers wird auf die Unteransprüche verwiesen.

Mit der Erfindung werden folgende Vorteile erzielt:

a) Festkörperproben, die sowohl aus flüchtigen als auch aus nicht flüchtigen Komponenten bestehen, z.B. Polymere mit flüchtigen Additiven werden bei der massenspektrometrischen Analyse nicht mehr dem Vakuum ausgesetzt sondern unter Atmosphärendruck oder Schutzgas gehalten und untersucht. Dadurch können Veränderungen der Proben weitgehend ausgeschlossen werden.

5
7

b) Es besteht die Möglichkeit, wasserhaltige Dünn-
schnitte oder Zellausstriche von biologischen Pro-
ben ohne strukturverändernde Belastung (Artefakte)
durch Trocknung und Vakuum zu untersuchen.

5 c) Die Kontamination durch schwerflüchtige Komponen-
ten und Zersetzungprodukte ist praktisch ausge-
schlossen (keine Memory Effekte).

10 d) Die zwischen der Entnahme einer Probe und der Auf-
nahme des Massenspektrums liegende Vorbereitungs-
zeit (Überführungszeit) kann wesentlich verkürzt
werden da die sonst notwendige Einschleusung der
Proben ins Massenspektrometer entfällt. Die Hand-
habung und Vorbereitung der Proben ist wesentlich
erleichtert.

15 e) Die Halterung der Proben außerhalb des Massen-
spektrometerraumes ist gerätetechnisch wesent-
lich einfacher und erlaubt mit verhältnismäßig
geringem Aufwand einen hohen Automatisierungsgrad.

Mit der Erfahrung werden daher der Massenspektrometrie
20 neue Anwendungsgebiete z.B. im Polymerbereich und in
Biologie und Medizin erschlossen. Bei letzteren handelt
es sich zwar nach wie vor um eine in vitro-Analyse,
die jedoch einer in vivo-Untersuchung bedeutend näher
kommt. Bisher kam auch die hohe Ortsauflösung der
25 konventionellen Mikromassenanalysatoren mit Laser-
anregung bei solchen Proben nicht zum Tragen, weil
bei der vorher notwendigen Präparation der biolo-

gischen Proben eine Entwässerung und damit verbunden eine Migration der nachzuweisenden Komponenten stattfindet, so daß eine räumliche Zuordnung der identifizierten Komponenten nicht mehr möglich war.

5 Durch die neue Technik wird die Aussagekraft der Punktanalyse zur Identifizierung der örtlichen Lage einer Komponente in der biologischen Probe (z.B. in einer Zelle) wesentlich verbessert.

10 Im folgenden werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand von Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 Schematisch den Aufbau eines Mikromassenanalytors mit Laseranregung

15 Fig. 2 die konventionelle Art der Probenhalterung bei einer Apparatur gemäß Fig. 1

Fig. 3 die neue Probenhalterung in Aufrißdarstellung

Fig. 4 eine Draufsicht der neuen Probenhalterung

20 Fig. 5 eine bevorzugte Ausführung der neuen Probenhalterung zur automatischen Analyse einer Vielzahl von Proben in Aufrißdarstellung und

Fig. 6 die Probenhalterung gemäß Fig. 5 in Draufsicht.

Der in Fig. 1 schematisch dargestellte Mikromassenanalytor mit Laseranregung besteht im wesentlichen aus einem Flugzeitmassenspektrometer 1 und einem gepulsten Hochleistungslaser 2 zur Verdampfung und Ionisierung der auf einem Objektträger 3 befindlichen Probe. Der Laserstrahl wird über einen halbdurchlässigen

gen Umlenkspiegel 4 mit Hilfe eines Objektivs 5 auf die Probe fokussiert. Mit einem Okular 6 kann die Positionierung der Probe im Massenspektrometerraum relativ zum Laserstrahl visuell kontrolliert und bei Bedarf nach-
5 justiert werden.

Der Laser 2 erzeugt einen sehr kurzen Lichtimpuls (Laserblitz), der die auf dem Objektträger 3 befindliche Probe schlagartig verdampft und zum größten Teil ionisiert. Die gebildeten Ionen werden von dem Flugzeit-
10 spektrometer 1 erfaßt, nach dem Prinzip der Laufzeitmessung separiert, und treffen dann nacheinander am Detektor ein. Als Detektor wird ein Multiplier 7 verwendet, der entsprechend den eintreffenden ionisierten Komponenten eine elektrische Impulsfolge erzeugt.
15 Die Impulsfolge wird nach Verstärkung 8 einem Transientenrekorder 9 zugeführt und anschließend auf einem Schreiber 10 und einem Oszillographen 11 aufgezeichnet. Der Transientenrekorder 9 wird von dem Laser 2 getriggert. Das zum Betrieb des Flugzeitmassenspektrometers
20 1 erforderliche Vakuum wird mit handelsüblichen Vakuum-pumpen erzeugt (Anschlüsse 12). Am Eingang des Massenspektrometers 1 ist zweckmäßig eine elektrische Linse (Ionenlinse) angebracht. Sie erzeugt ein Ziehfeld, mit dem die durch den Laserblitz erzeugten Ionen erfaßt
25 und nachbeschleunigt werden.

Bei den konventionellen Apparaturen wird als Objektträger für die Probe eine dünne polymere Trägerfolie verwendet, die im Hochvakuum des Massenspektro-

meters angeordnet ist (s. Fig. 2). Die Abdichtung zum Hochvakuum erfolgt durch eine Glasscheibe 13 die über einen Dichtungsring 14 an der Außenwand 15 des Massenspektrometers 1 anliegt. Die Probe selbst ist auf einer polymeren Trägerfolie 3 angeordnet, die ihrerseits auf einer Probenhalterung 16 ruht. Die Probenhalterung 16 befindet sich im Hochvakuum und ist über einer zentralen Aussparung 17 in die Außenwand 15 des Massenspektrometers eingebaut. Der Laserstrahl wird durch die Glasscheibe 13 (Eintrittsfenster) auf die Trägerfolie 3 mit der darauf befindlichen Probe fokussiert.

Es wurde nun gefunden, daß die dünne polymere Trägerfolie (Dicke ca. $0,1\mu\text{m}$) direkt als Trennfolie zwischen der Atmosphäre und dem Massenspektrometer (Hochvakuum) dienen kann und diese Trägerfolie auch bei mehrmaligem Durchschuß mit dem Laser nicht aufreißt. Dabei wurde festgestellt, daß das zum Betrieb des Massenspektrometers erforderliche Vakuum selbst durch mehrere solcher Löcher (Durchmesser ca. $2\mu\text{m}$) nicht beeinträchtigt wird. Diese Tatsache ermöglicht es, daß die Trägerfolie 3 mit der Probe auf der Außenseite des Massenspektrometers unter Atmosphärendruck oder Schutzgas angebracht wird. Der Laserblitz sorgt dann dafür, daß die auf der Folie befindliche Probe durch ein gleichzeitig entstehendes Loch in der Folie in den Massenspektrometerraum verdampft. Eine entsprechend modifizierte Probenhalterung ist in Fig. 3 (Aufriß) und Fig. 4 (Draufsicht) dargestellt.

- 9 -
M

Die Trägerfolie 3 mit der Probe liegt wie bei der Ausführung gemäß Fig. 2 auf der Probenhalterung 16, die jetzt atmosphärenseitig über der Aussparung 17 an dem Massenspektrometer 1 angeordnet ist. Die Abdichtung gegenüber dem Massenspektrometerraum erfolgt mittels des Dichtungsringes 14, der jetzt zwischen der Probenhalterung 16 und der Außenwand 15 des Massenspektrometers liegt. Die Trägerfolie 3 bildet bei dieser Ausführung das Eintrittsfenster zum Massenspektrometer hin. Als Probenhalter 16 können Blenden benutzt werden, wie sie z.B. in der Elektronenspektroskopie üblich sind. Dabei handelt es sich um massive Metallplatten, z.B. aus Platin, Silber, Stahl u.a. mit einer Dicke von ca. 1 mm, die eine oder mehrere Bohrungen 18 mit Durchmessern zwischen 20 und 100 μ m besitzen. Die Metallplatte kann auch zentrisch mit einer größeren Bohrung versehen sein, die ihrerseits mit einem Metallnetz mit Maschenweiten zwischen 20 und 100 μ m abgeschlossen ist. Auf diese Metallblenden wird die dünne Polymerfolie gespannt, die einerseits als Vakuumabschluß dient und andererseits als Objektträger für die zu untersuchende Substanz. Durch die Metallblende (Ein- oder Mehrlochblende bzw. Netz oder Gitter) wird die Trägerfolie mechanisch stabilisiert.

Die Trägerfolie 3 besteht z.B. aus Kollodiumlack oder Zapponlack oder aus Formvar. Diese Materialien werden auch in der Elektronenmikroskopie als Trägerfolien benutzt. Die Aufbringung der Trägerfolie 3 auf den Probenhalter 16 erfolgt durch Absenken einer durch Sprei-

ten von Kollodiumlack oder Zapponlack oder Formvar auf einer Wasseroberfläche erzeugten, sehr dünnen Folie, z.B. in einem Scheidetrichter oder durch Herstellung der Trägerfolie durch Spreiten des Lackes auf einem glatten Träger, z.B. auf einer Glasplatte. Das Ablösen der Folie geschieht z.B. durch langsames Eintauchen in Wasser. Anschließend wird die Trägerfolie 3 auf den Probenhalter 16 überführt.

Der Beweis für die überraschend hohe Vakuumfestigkeit der Trägerfolien selbst nach Durchschuß mehrerer Löcher mit dem Laserstrahl konnte mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen erbracht werden. Dabei zeigte es sich, daß der Laserstrahl nahezu kreisrunde Löcher mit einem Durchmesser von 1 bis 2 μm in die $0,1\mu\text{m}$ starke Trägerfolie schmilzt. Durch systematische Untersuchungen konnte sichergestellt werden, daß die Betriebsbereitschaft der Apparatur auch nach mehreren Durchschüssen erhalten bleibt. Die aufgrund der Durchschlüsse entstehenden Lecks sind offensichtlich so klein, daß das Vakuum in der Apparatur nicht beeinträchtigt wird. Im übrigen besteht natürlich auch die Möglichkeit, daß nach einem Durchschuß das in der Trägerfolie 3 entstandene Loch durch Betupfen mit einem Lack (z.B. Kollodiumlack) sofort wieder verschlossen wird.

Eine bevorzugte Ausführung der Probenhalterung zur automatischen Untersuchung einer Vielzahl von Proben ist in Fig. 5 (Querschnitt) und in Fig. 6 (Draufsicht) darge-

- 11 -
13

stellt. Die Probenhalterung 16 ist hier eine quadratische Platte mit z.B. $5 \times 5 = 25$ Einzellochbohrungen 19 mit einem Durchmesser von $50\mu\text{m}$. Kongruent zu dieser Viel-fachlochblende sind auf der Trägerfolie 3 nach Art einer Matrix eine Vielzahl von verschiedenen Proben punktuell aufgebracht. Die Probenhalterung 16 ist hier Bestandteil eines in 2 Koordinaten (x und y) verschiebbaren Kreuztisches. Der Kreuztisch kann mit Hilfe von Schrittmotoren 20 und 21 in der x/y-Ebene beliebig positioniert werden. Auf den den Motoren gegenüberliegenden Seiten ist der Kreuztisch mit Rückholfedern 22 und 23 versehen. Die Motoren 20 und 21 sind mit einer Programmsteuerung verbunden, die es gestattet, die Einzelproben 24 nacheinander in die optische Achse, d.h. an die Stelle des Laserstrahles, zu bringen. Die am Auftreffpunkt des Laserstrahles zentrierte Probe 24 wird dann durch einen Laserblitz verdampft, dabei z.T. ionisiert und gelangt durch das gleichzeitig in der Trägerfolie entstehende Mikroloch sowie durch die daran anschließende Bohrung 19 in den Massenspektrometerraum. Die Ionenwolke wird dort von einer elektrischen Linse erfaßt und dem nachgeschalteten Flugzeitmassenspektrometer zugeführt, wo eine Trennung nach dem Masse/Ladungsverhältnis erfolgt und die Intensitäten der Molekülpeaks aufgezeichnet werden. Im Prinzip kann jedes Massenspektrometer verwendet werden, das eine Simultananzeige des Massenspektrums erlaubt. Flugzeitmassenspektrometer erfüllen diese Forderung und haben sich auch deswegen besonders bewährt, weil sie eine hohe Transmission besitzen.

Für den Fall, daß die Ionisierung der Probe durch den Laserblitz nicht ausreicht, kann am Eingang 17 des Massenspektrometerraumes eine weitere Ionenquelle zur Nachionisierung der verdampften Probe eingebaut werden.

5 Der gesamte Analysenablauf für die Analyse der $5 \times 5 = 25$ Einzelproben erfolgt mit Hilfe der mit den Schrittmotoren 20 und 21 gekoppelten Programmsteuerung vollautomatisch. Insbesondere können die Intensitäten der zu jeder Einzelanalyse gehörenden Molekülpeaks in einem 10 nachgeschalteten Rechner den Einzelproben zugeordnet werden. Ein derartig hoher Automatisierungsgrad konnte bei Massenspektrometern vergleichbarer Bauart bisher nicht erreicht werden.

15 Schwierigkeiten bereitet es zunächst, die nachzuweisende Substanz auf kleinen vorbezeichneten Flächen, z.B. kreisförmige Flächen von 10 bis $50 \mu\text{m}$, auf der Trägerfolie 3 zu deponieren. Dieses Problem kann aber dadurch gelöst werden, daß die an sich hydrophobe polymere Trägerfolie durch Bestrahlung mit einem 20 entsprechend gebündelten Elektronen- oder Ionenstrahl, oder durch Behandlung in einer mit Gleich- oder Wechselstrom betriebenen Gasentladung unter Zwischenschaltung entsprechender Blenden mit kreisförmigen Ausschnitten geeignete Größe örtlich hydrophilisiert wird. Auf diese Weise kann man die nachzuweisenden Substanzen aus einer polaren, insbesondere 25 wässrigen Lösung oder Suspension gezielt punktuell niederschlagen und erhält so die oben beschriebene Probenmatrix.

Diese Art der Präparation kann allgemein angewandt werden, wenn die Aufgabe besteht, zum Zwecke massenspektrometrischer Untersuchungen die in Lösung befindliche Substanz auf einer sehr kleinen Fläche des Objektträgers auszukristallisieren oder aus der Suspension durch Trocknung der flüssigen Phase niederzuschlagen. Durch die Konzentrierung der Probe auf einer eng begrenzten Fläche kann man die Flächendichte der nachzuweisenden Komponente auf dem Objektträger und damit die Nachweisempfindlichkeit erhöhen. Dieser Fortschritt kann auch für andere Verfahren der Festkörpermassenspektrometrie, wie z.B. die Sekundärionenmassenspektrometrie ausgenutzt werden.

15 Es sind auch Anwendungsfälle denkbar, wo das Massenspektrometer nur dazu benutzt wird, um eine Vielzahl von Proben daraufhin zu untersuchen, ob eine bestimmte Komponente vorhanden ist oder nicht, oder um systematische Konzentrationsbestimmungen für eine Komponente durchzuführen. In solchen Fällen wird das MS fest auf die Masse eingestellt, die detektiert werden soll. Bei diesen Untersuchungen kann die neue Probenhalterung in Verbindung mit dem Laser auch mit konventionellen MS, z.B. Quadrupol-MS, kombiniert werden. Der Laser dient dann nur dazu, die außen angeordnete Probe in den MS-Raum bzw. in die Ionenquelle zu transportieren. Der Transport beruht dabei einerseits auf der Verdampfung durch den Laserblitz und andererseits auf der Einströmung ins Vakuum durch das eingebrannte Loch in der Trägerfolie.

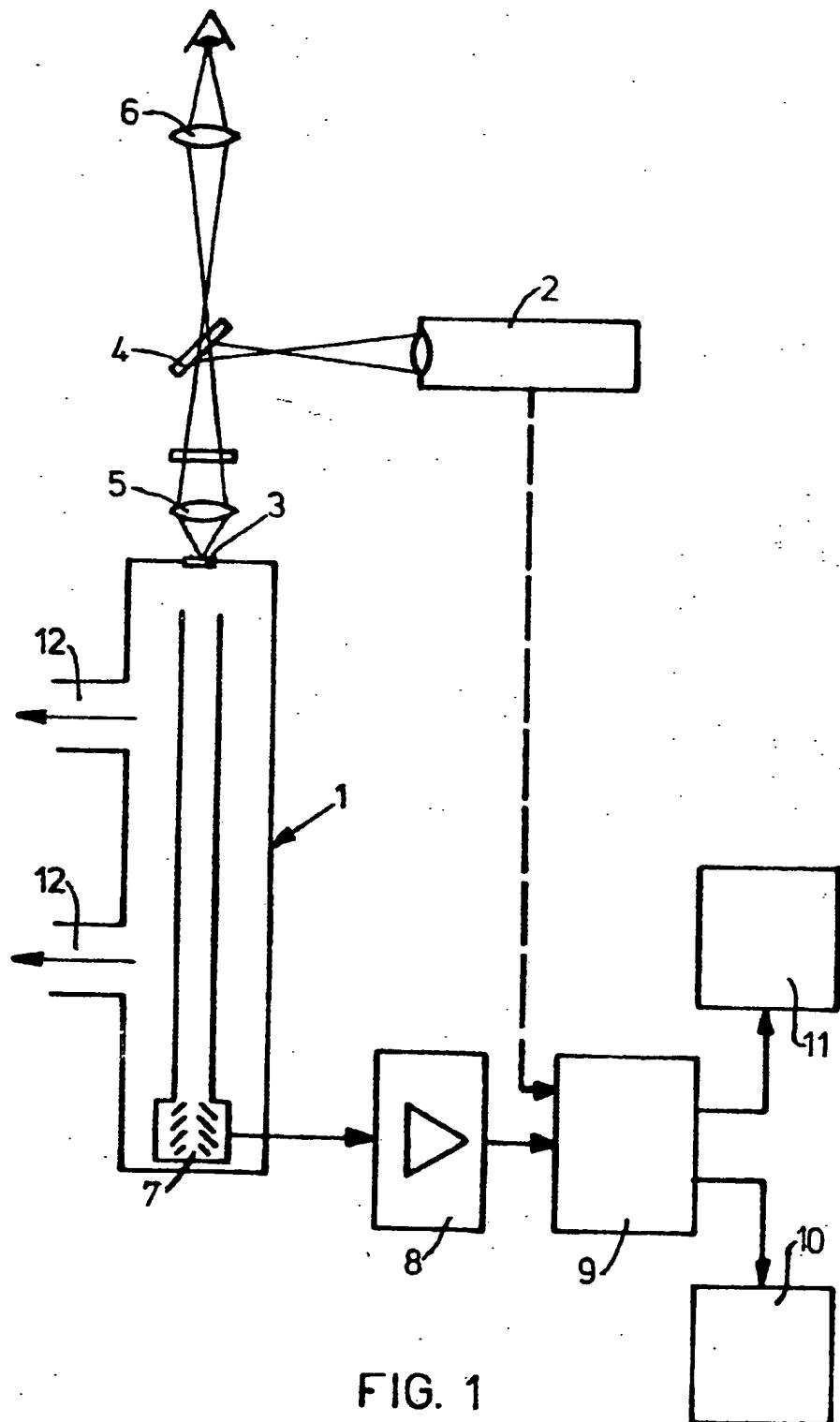


FIG. 1

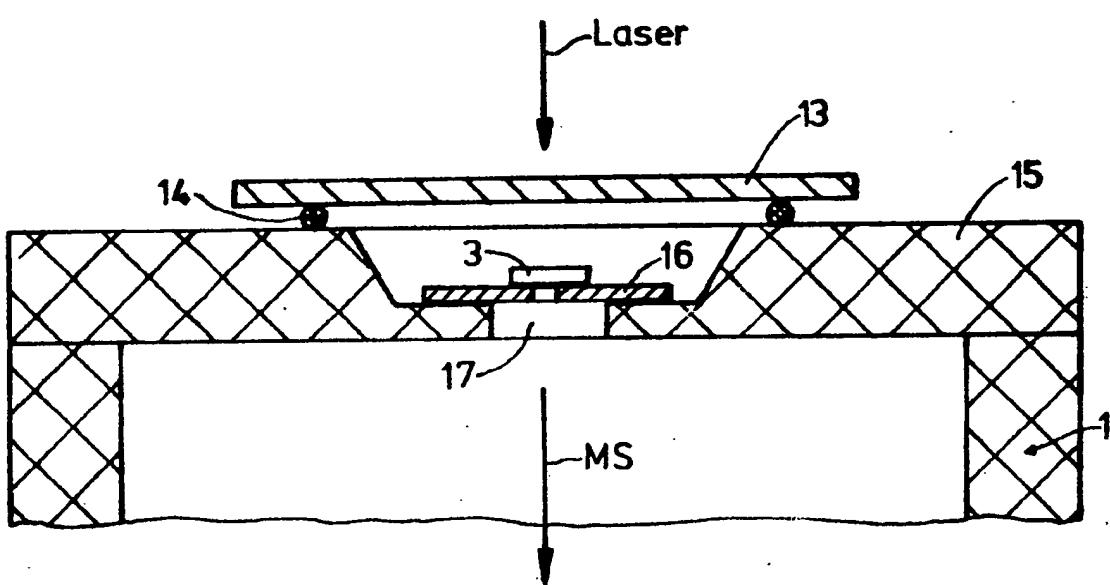


FIG. 2

-17-

3221681

3/4

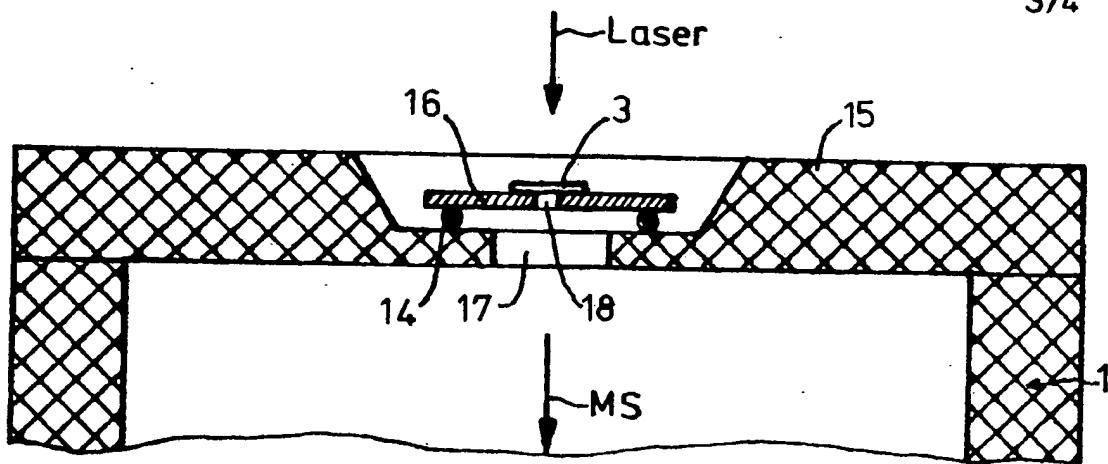


FIG. 3

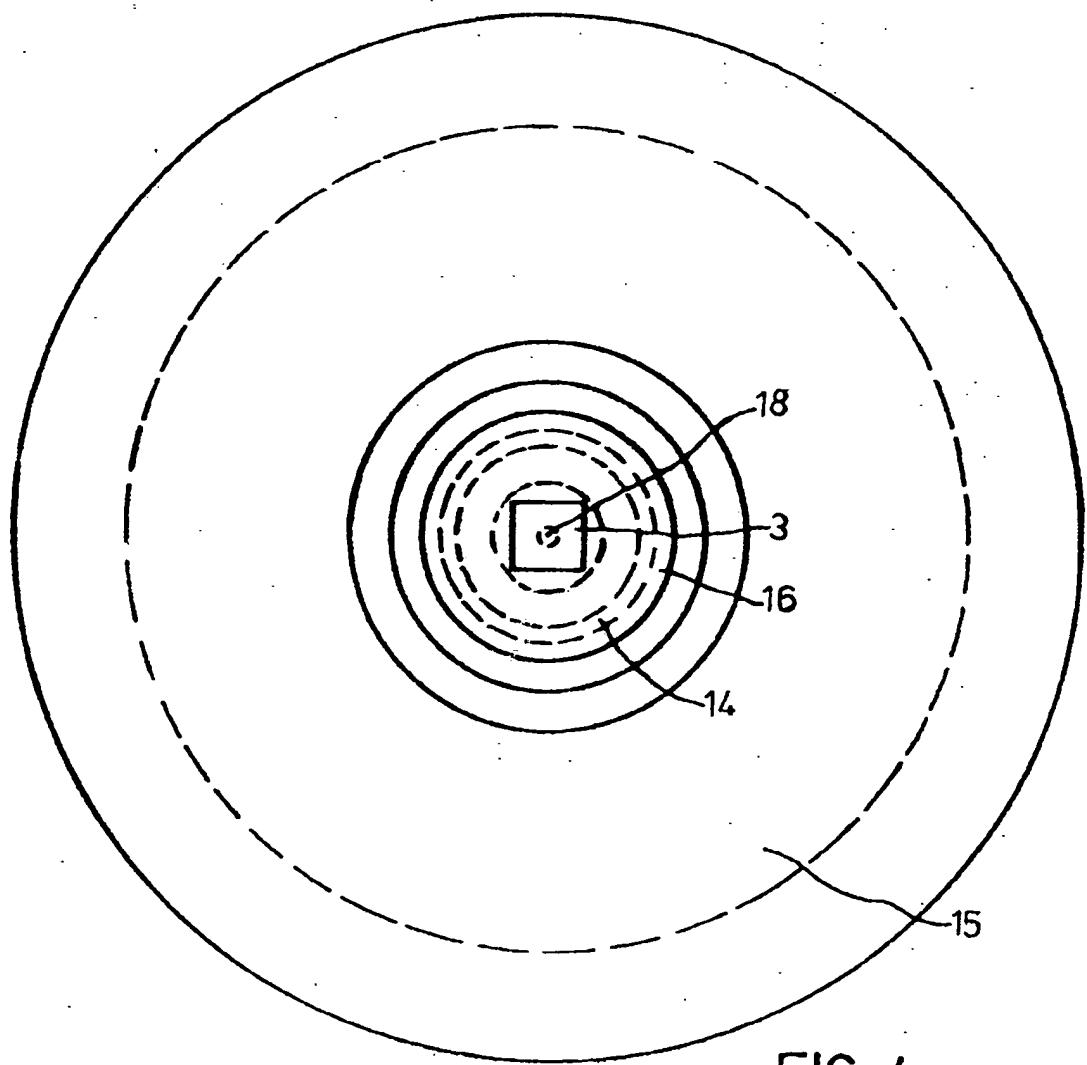


FIG. 4

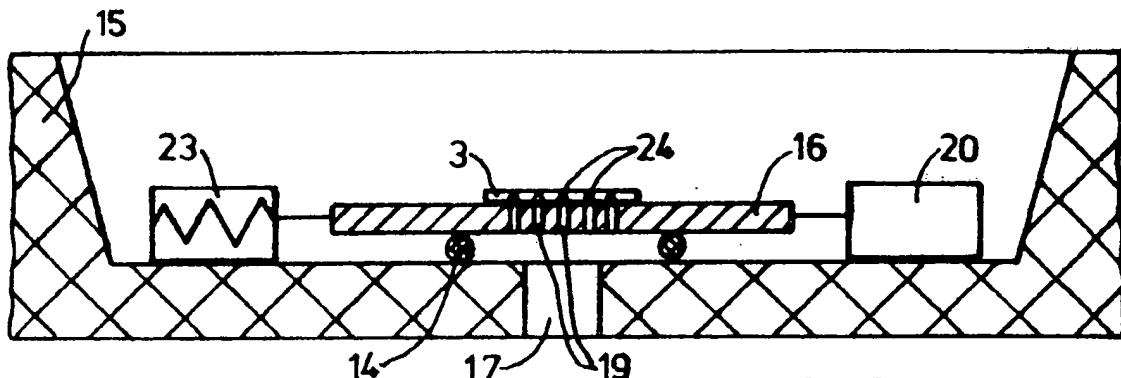


FIG. 5

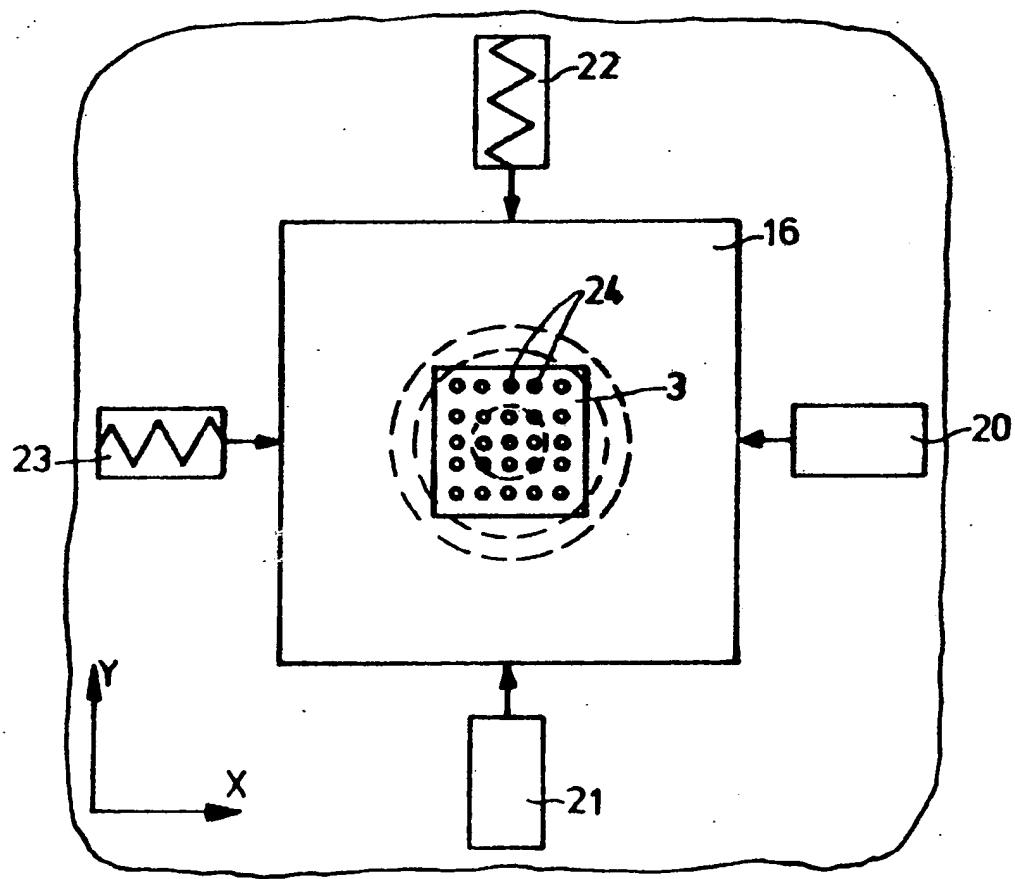


FIG. 6

PTO 98-4116

CY=DE DATE=19831208 KIND=A1
PN=3,221,681

MASS SPECTROMETER WITH EXTERNAL SAMPLE HOLDER
[Massenspekrometer mit externer Probenhalterung]

Alfred Benninghoven, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. August 1998

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY (10) : DE
DOCUMENT NUMBER (11) : 3221681
DOCUMENT KIND (12) :
(13) : A1
PUBLICATION DATE: (43) : 19831208
APPLICATION NUMBER (21) : P3221681.5
APPLICATION DATE (22) : 19820608
ADDITION TO (61) :
INTERNATIONAL CLASSIFICATION (51) : H01J 49/04
DOMESTIC CLASSIFICATION (52) :
PRIORITY COUNTRY (33) :
PRIORITY NUMBER (31) :
PRIORITY DATE (32) :
INVENTOR (72) : BENNINGHOVEN, ALFRED;
KÄMPF, GÜNTHER, HOLM,
REIMER; HEINEN, HANS
JOSEF
APPLICANT (71) : BAYER AG
TITLE (54) : MASS SPECTROMETER WITH
EXTERNAL SAMPLE HOLDER
FOREIGN TITLE [54A] : Massenspektrometer mit
externer Probenhalterung

1. Mass spectrometer (1) with a laser (2) for evaporating and ionizing the sample to be investigated, is characterized by the sample fixed on a thin polymer foil (3) being placed outside of the mass spectrometer (1) under atmospheric pressure or protective gas and the polymer foil (3) being built as an input window for the mass spectrometer chamber.

2. Mass spectrometer in accordance with Claim 1, is characterized by a polymeric carrier foil (3) being mechanically stabilized by a network or a lattice or by a one or more hole baffle (16).

3. Mass spectrometer in accordance with Claims 1 through 2, is characterized by depending on the type of matrix, a number of samples (24) being placed on the carrier foil (3) and the carrier foil (3) being able to be adjusted relative to the laser beam with the help of a stage.

4. Mass spectrometer especially in accordance with Claim 3 is characterized by a hydrophobic carrier foil (3) through local hydrophilization containing a surface pattern corresponding to the sample matrix and the samples (24) being discharged onto the carrier foil (3) by wetting the hydrophilic regions with a solution or suspension containing the sample.

5. Mass spectrometer in accordance with Claims 1 through 4, /2 is characterized by ions formed by a laser flash and entering a

*Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

mass spectrometer chamber being captured and post-accelerated by a tractive field.

6. Mass spectrometer in accordance with Claims 1 through 5, is characterized by a mass spectrometer containing an additional ion source for post-ionization of an evaporated sample.

7. Mass spectrometer in accordance with Claims 1 through 6, is characterized by the mass spectrometer being a time of flight spectrometer.

Mass Spectrometer with External Sample Container

/3

Mass spectrometers have become an indispensable aid in industry and research. Through use of gentle ionization methods, to an increasing extent mass spectrometry has expanded the identification and analysis of complicated organic compounds. Through this, new uses have resulted in the pharmaceutical and plant protection sector as well as recently also in biomedical research.

With all mass spectrometry investigations of solids, the sample to be investigated previously had to be placed on a suitable object carrier in an evacuated mass spectrometer chamber. This is, as a rule, associated with considerable time expenditure, since the mass spectrometer must be opened and then re-evacuated. With antechamber devices an automatization can thus be achieved and the preparation time characteristically shortened. However, they have the disadvantage that the apparatus is expensive and, in general, difficult to handle.

Frequently solid samples contain high volatility components, 14 in addition to low volatility components. The former evaporate so quickly under some circumstances in the mass spectrometer chamber that the composition of the sample has changed at the time of analysis. Mass spectrometric analysis then leads to false results (vacuum sensitive substances).

A further disadvantage of conventional solid mass spectrometry is that traces of low volatility components precipitate at other locations in the mass spectrometer chamber and with subsequent measurements can occur as background (memory effect). The high volatility components are less problematic in this regard, since they can be optionally pumped out with simultaneous heating of the apparatus.

Recently mass spectrometers have been developed in which the sample in the mass spectrometer chamber is evaporated and ionized by a laser flash. The ions formed are identified with the help of a time of flight spectrometer. Such mass spectrometers have high transmission, high spatial resolution and, due to gentle ionization, are also suitable for analysis of thermally labile organic compounds. Especially, thereby, for the first time biological samples can be investigated with high spatial resolution (human or animal tissue). (See, for example, R. Kaufmann et al., European Spectroscopy News 20 (1978), 15 pp. 41-43). Here, prior postmortem changes and drying artifacts represent a characteristic limiting of usage possibilities.

Previous there was no starting point, as described above, to combat the disadvantages and difficulties associated with transformation in a mass spectrometer.

The invention starts here. It achieves the goal, using laser desorption, of creating a mass spectrometer with which vacuum sensitive substances can be better investigated.

In accordance with the invention the problems described above can be solved by a sample fixed on a thin, polymeric foil not being placed as previously in the mass spectrometer chamber, but instead on the outside of the mass spectrometer under atmospheric pressure or protective gas, whereby the polymeric foil is built as an input window for the mass spectrometer chamber. Surprisingly it has been found that a thin, polymeric carrier foil (thickness ca. 0.1 μm) can serve directly as the separating foil between the atmosphere and the mass spectrometer (high vacuum) and this carrier foil does not tear even after multiple shots with a laser.

Purposefully, the polymeric carrier foil is mechanically stabilized by a network or a lattice or by a one or more hole baffle.

16

A further development in connection with the invention consists of, depending on the matrix, a number of samples being placed on the carrier foil and being able to be adjusted relative to the laser beam with the help of a stage. Advantageously, such a sample matrix is realized by a hydrophobic carrier foil through local hydrophilization containing a surface pattern corresponding

to the sample matrix and the sample being discharged onto the carrier foil by wetting the hydrophilic regions with a solution or suspension containing the sample.

With respect to further improvements and favorable example forms of the mass spectrometer, see the subclaims.

With the invention the following advantages are obtained:

a) Solids consisting both of volatile and also non-volatile components, for example, polymers with volatile additives, are no longer exposed to a vacuum, but instead held under atmospheric pressure or protective gas and investigated. Thereby, changes in the sample can be largely eliminated.

b) There is a possibility of investigating water-containing thin/⁷ sections or cell smears of biological samples without stress that changes the structure (artifacts) through drying and vacuum.

c) Contamination by low volatility components and degradations products is practically eliminated (no memory effect).

d) The preparation time (transformation time) between the removal of the sample and the taking of the mass spectrum can be characteristically shortened, since the otherwise necessary locking of the sample in the mass spectrometer is eliminated. Handling and preparation of the sample is characteristically made easier.

e) The holding of the sample outside of the mass spectrometer chamber is characteristically much simpler with respect to device technology and allows a high degree of

automatization with relatively low expenditure.

With the invention, mass spectrometry has therefore unlocked new usage areas, for example, in the polymer arena and in biology and medicine. With the latter, in vitro analysis is thus involved as before, however, in vivo investigations are significantly closer. Previously, high spatial resolution with conventional micromass analyzers with laser excitation could not be obtained with such samples, since with previously necessary preparation of biological samples a drying and thereby associated migration of the components to be analyzed occurred, so that spatial association of the identified components was no longer possible. Through the new technology the predictive power of point analysis for identification of local positions of components in biological samples (for example, in a cell) is characteristically improved. /8

In the following, example forms of the invention are more closely explained using figures. The figures show:

Figure 1 schematically the design of a micromass analyzer with laser excitation

Figure 2 a conventional type of sample holder with an apparatus in accordance with Figure 1

Figure 3 a new sample holder in cut away representation

Figure 4 a top view of the new sample holder

Figure 5 a favorable example of the new sample holder for automatic analysis of a number of samples in cut away

representation and

Figure 6 a sample holder in accordance with Figure 5 in top view.

The micromass analyzer with laser excitation shown schematically in Figure 1 characteristically consists of a time in flight spectrometer [1] and pulsed, high capacity laser [2] for evaporating and ionizing a sample found on object carrier [3]. The laser beam is focused on a sample through a semi-transparent turning mirror [4] with the help of objective [5]. With ocular [6] the positioning of the sample in the mass spectrometer chamber can be visually controlled relative to the laser beam and adjusted as desired. 19

Laser [2] creates a very short light impulse (laser flash) that suddenly evaporates and mostly ionizes the sample found on object carrier [3]. The ions formed are captured by time in flight spectrometer [1], separated in accordance with the principle of run time measurement and then arrive one after another at a detector. As a detector, multiplier [7] is used that creates an electrical series of impulses corresponding to the ionized components. The series of impulses is supplied after amplification [8] to transient recorder [9] and then recorded on recorder [10] and oscillograph [11]. Transient recorder [9] is triggered by laser [2]. The vacuum required to operate time in flight spectrometer [1] is created with commercially available vacuum pumps (connection [12]). An electric lens (ion lens) is

purposefully placed at the entrance to mass spectrometer [1]. It creates a tractive field with which the ions created by the laser flash are captured and post-accelerated.

With conventional apparatus a thin, polymeric carrier foil is used as object carrier that is placed in the high vacuum of the mass spectrometer. (See Figure 2.) The sealing for the high 10 vacuum occurs through glass disc [13] that is placed over sealing ring [14] on outer wall [15] of mass spectrometer [1]. The sample itself is placed on polymeric carrier foil [3] that itself rests on sample holder [16]. Sample holder 16 is found in high vacuum and is built over central opening [17] in outer wall [15] of the mass spectrometer. The laser beam is focused through glass disc [13] (input window) on carrier foil [3] with the sample found on top of it.

It has been found that a thin, polymeric carrier foil (thickness ca. 0.1 μm) can serve directly as the separating foil between the atmosphere and the mass spectrometer (high vacuum) and this carrier foil does not tear even after multiple shots with a laser. Thereby, it has been determined that the vacuum required to operate the mass spectrometer is itself not damaged by several holes (diameter ca. 2 μm). This fact allows carrier foil [3] with the sample to be placed on the outside of the mass spectrometer under atmospheric pressure or protective gas. The laser flash then acts to evaporate the sample found on the foil through a simultaneously resulting hole in the foil into the mass spectrometer chamber. A correspondingly modified sample holder

is shown in Figure 3 (vertical section) and Figure 4 (top view).

Carrier foil [3] with the sample is positioned as in the /11 example in accordance with Figure 2 on sample holder [16] that is now placed on the atmosphere side over opening [17] on mass spectrometer [1]. The seal with respect to the mass spectrometer chamber occurs by means of sealing ring [14] that is now found between sample holder [16] and outer wall [15] of the mass spectrometer. Carrier foil [3] forms, in this example form, an input window to the mass spectrometer. As sample holder [16], baffles can be used such as are customary, for example, in electron spectroscopy. Thereby, massive metal plates are involved, for example, made of platinum, silver, steel, etc., with a thickness from ca. 1 mm, that have one or more borings [18] with diameters between 20 and 100 μ m. The metal plates can also be provided centrally with a larger boring that itself is enclosed with a metal mesh with grid square width between 20 and 100 μ m. On this metal baffle, a thin, polymeric foil is stretched that serves, on the one hand, as a vacuum seal and, on the other hand, as an object carrier for the substance to be investigated. The carrier foil is mechanically stabilized by a metal baffle (a one or more hole baffle or network or lattice).

Carrier foil [3] consists, for example, of collodion dope or Zapon varnish or of formvar. These materials are also used in electron microscopy as carrier foils. Placement of carrier foil [3] on sample holder 16 occurs by lowering a very thin foil created by spreading collodion dope or Zapon varnish on the /12

surface of water, for example, in a separating funnel or by manufacture of carrier foil [3] by spreading varnish on a smooth carrier, for example, on a glass plate. The release of the foil occurs, for example, by slow submersion in water. Carrier foil [3] is then transfer onto sample holder [16].

The proof for the surprisingly high vacuum resistance of the carrier foil even with several holes shot through with a laser beam can be produced with the help of electromicrographs. Thereby, a laser beam has been shown to melt nearly circular holes with a diameter from 1 to 2 μm in a 0.1 μm thick carrier foil. Through systematic investigation it was determined that the operating readiness of the apparatus was maintained even after several shots. The leaks resulting from the shots are apparently so small that the vacuum in the apparatus is not damaged. In addition, of course, there is the possibility of holes resulting in the carrier foil 3 being immediately closed again after a shot by dabbing with varnish (for example, collodion dope).

A favorable example form of the sample holder for automatic investigation of a number of samples is shown in Figure 5 (cross section) and in Figure 6 (top view). Sample holder 16 is here a 13 square plate with, for example, $5 \times 5 = 25$ individual borings [19] with a diameter of 50 μm . Congruent to this multiple hole baffle, a number of different samples are selectively placed depending on the type of matrix on carrier foil [3]. Sample holder [16] is here a component of a stage displaceable in 2

coordinates (x and y). The stage can be positioned as desired in the x/y plane with the help of step motors [20 and 21]. On the sides opposite the motors the stage is provided with return springs [22 and 23]. Motors [20 and 21] are associated with program control that allows individual samples to be brought one after another into the optical axis, that is, to the location of the laser beam. Sample [24] centered at the impact point of the laser beam is then evaporated by a laser flash, thereby partially ionized and through the microholes simultaneously resulting in the carrier foil as well as through boring [19] connected to it, moving into the mass spectrometer chamber. The ion cloud is captured there by an electric lens and supplied to a connected time in flight spectrometer, whereby a separation based on the mass/charge ratio occurs and the intensity of the molecular peaks is recorded. In principle, any mass spectrometer can be used that allows simultaneous indication of the mass spectrum. Time in flight spectrometers fulfil this requirement and have proved of special value since they have a high transmission.

For cases where the ionization of the sample is not sufficient through the laser flash, on entrance [17] to the mass spectrometer chamber, a further ion source for post-ionization of the evaporated sample can be built. /14

The entire analysis course for the analysis of $5 \times 5 = 25$ individual samples occurs with the help of completely automatic program control coupled with step motors [20 and 21]. The intensity of the molecular peaks belonging to each individual

analysis can especially be assigned in a connected computer to individual samples. This type of high degree of automatization could previously not be obtained with mass spectrometers of comparable design.

There are next difficulties in depositing the substance to be analyzed on small, predesignated surfaces, for example, circular surfaces from 10 to 50 μm on carrier foil [3]. This problem can be solved however, by the hydrophobic polymeric carrier foil being made locally hydrophilic through illumination with a correspondingly focused electron or ion beam or by treatment with direct- or an alternating-current-driven gas discharge with intermediate switching of corresponding baffles with circular cutouts of suitable size. In this manner the substances to be analyzed can be selectively deposited from a polar, especially aqueous solution or suspension and the sample matrix described above can be obtained.

This type of preparation can be applied, in general, when the goal, for the purpose of mass spectrometric investigations, is to crystallize or to deposit substances found in solution on a very small surface of the object carrier by drying the liquid phase. Through concentrating the sample on a very narrowly limited surface the surface thickness of the components to be analyzed can be increased on the object carrier and the sensitivity of the analysis, thereby, increased. This advance can also be used for other processes in solid mass spectrometry such as, for example, secondary ion mass spectrometry.

Usage cases are also conceivable where the mass spectrometer is only used to investigate whether a certain component is present or not in a number of samples, or to systematically carry out concentration determinations for a component. In such cases the mass spectrometer is adjusted to the mass to be detected. In these investigations the new sample holder in connection with the laser can also be combined with convention mass spectrometry, for example, quadrupole-MS. The laser then only serves to transport the sample located outside into the MS chamber or into the ion source. Transport is based thereby, on the one hand, on evaporation by a laser flash and, on the other, on inflow into the vacuum through a hole burned in the carrier foil.

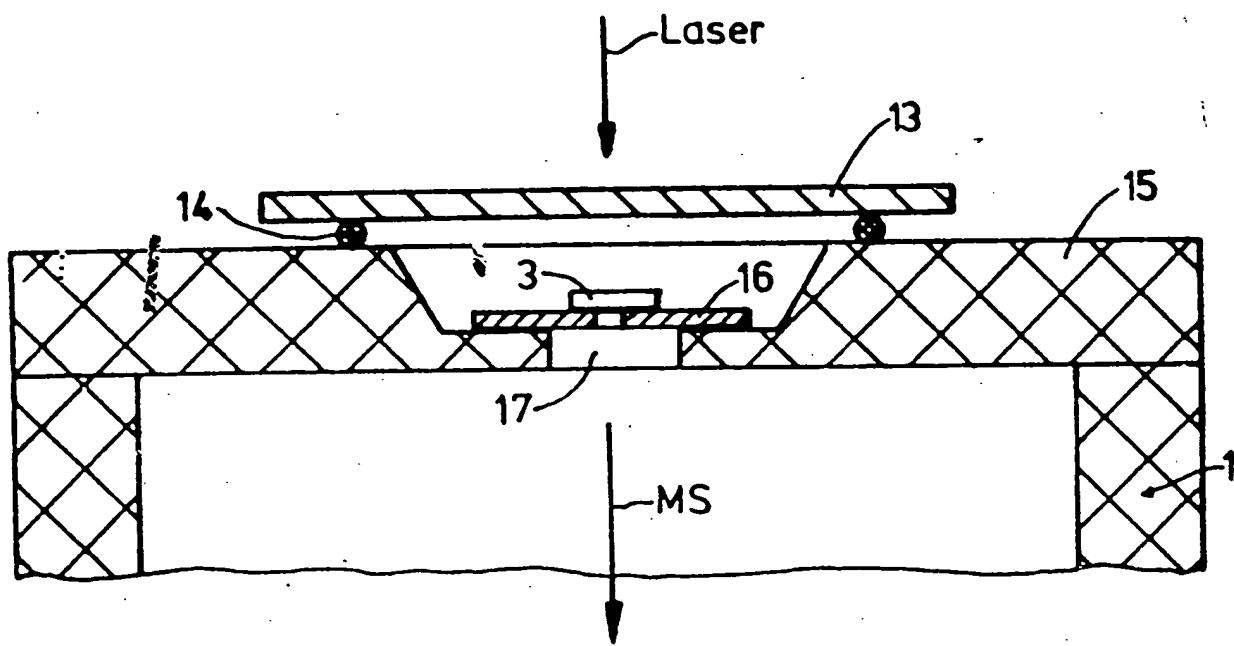


FIG. 2

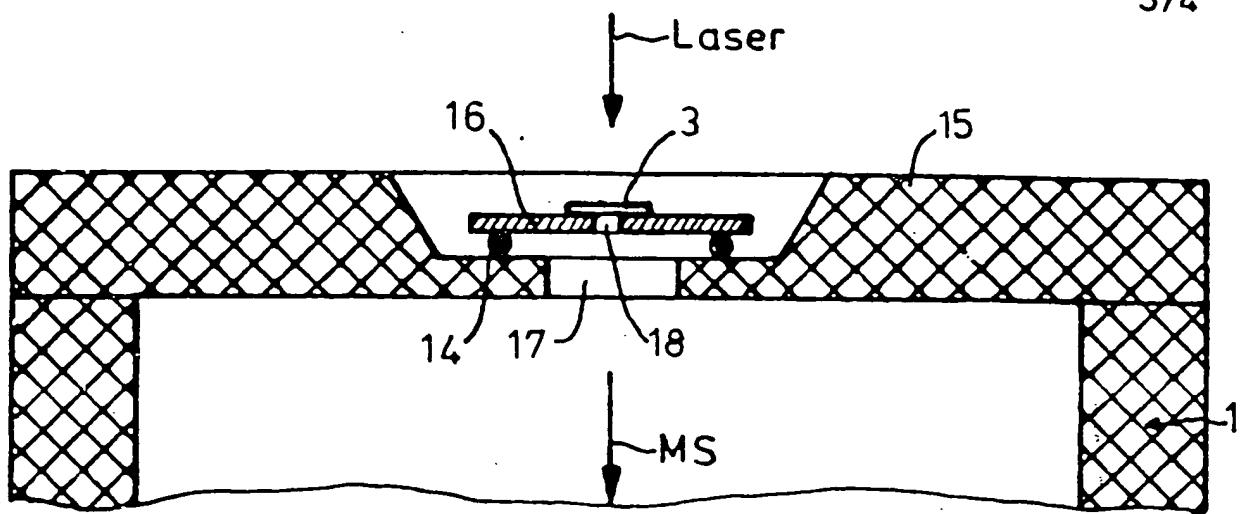


FIG. 3

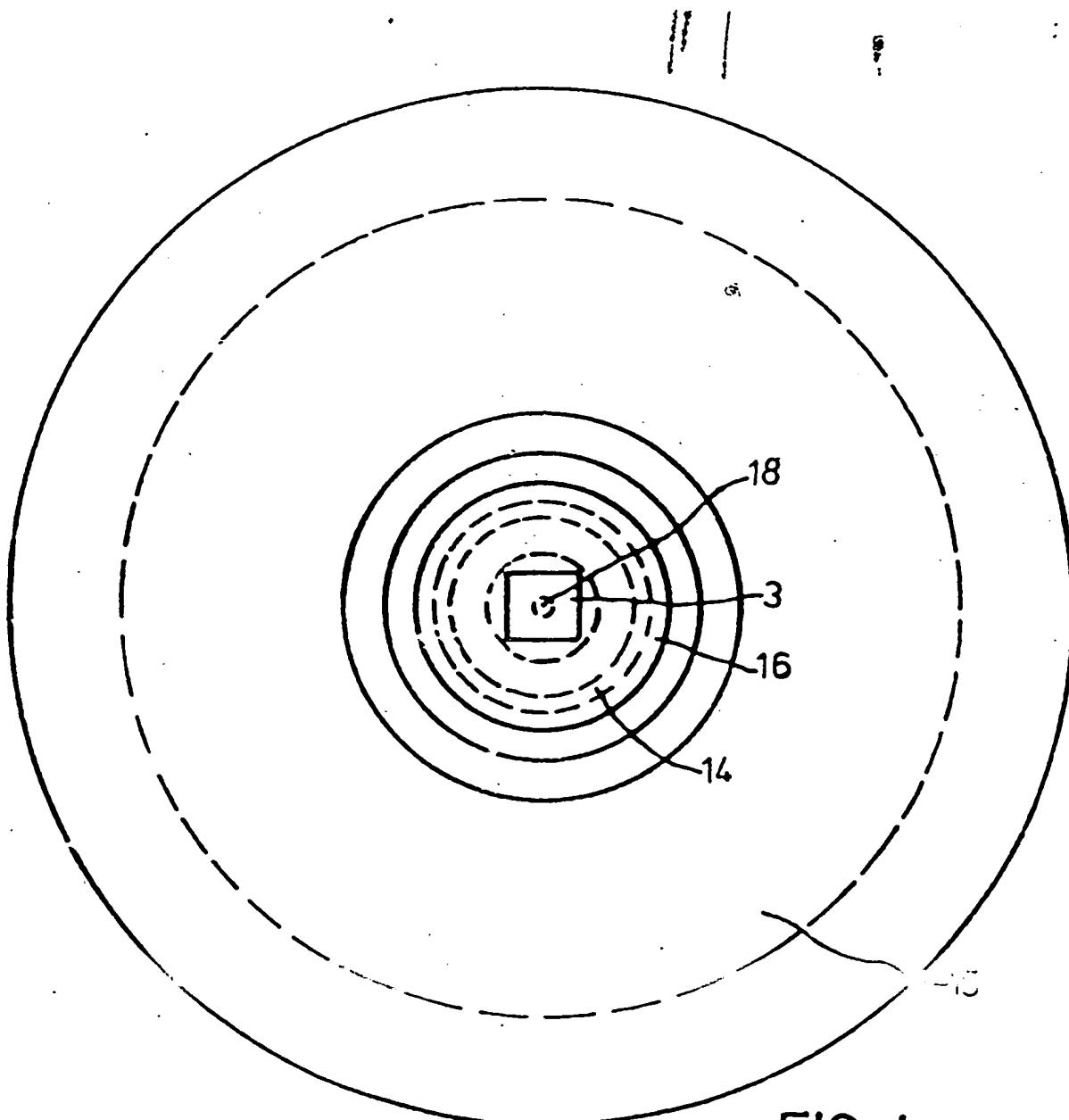


FIG. 4

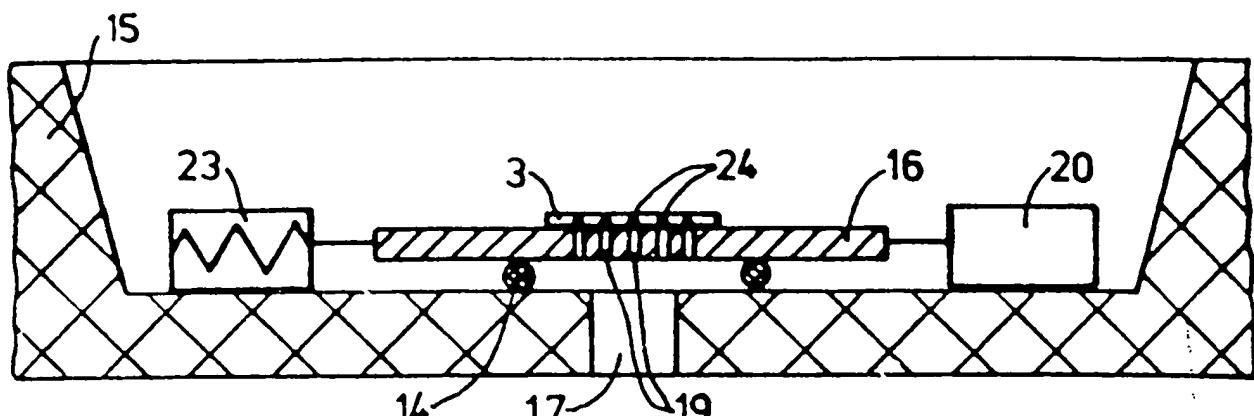


FIG. 5

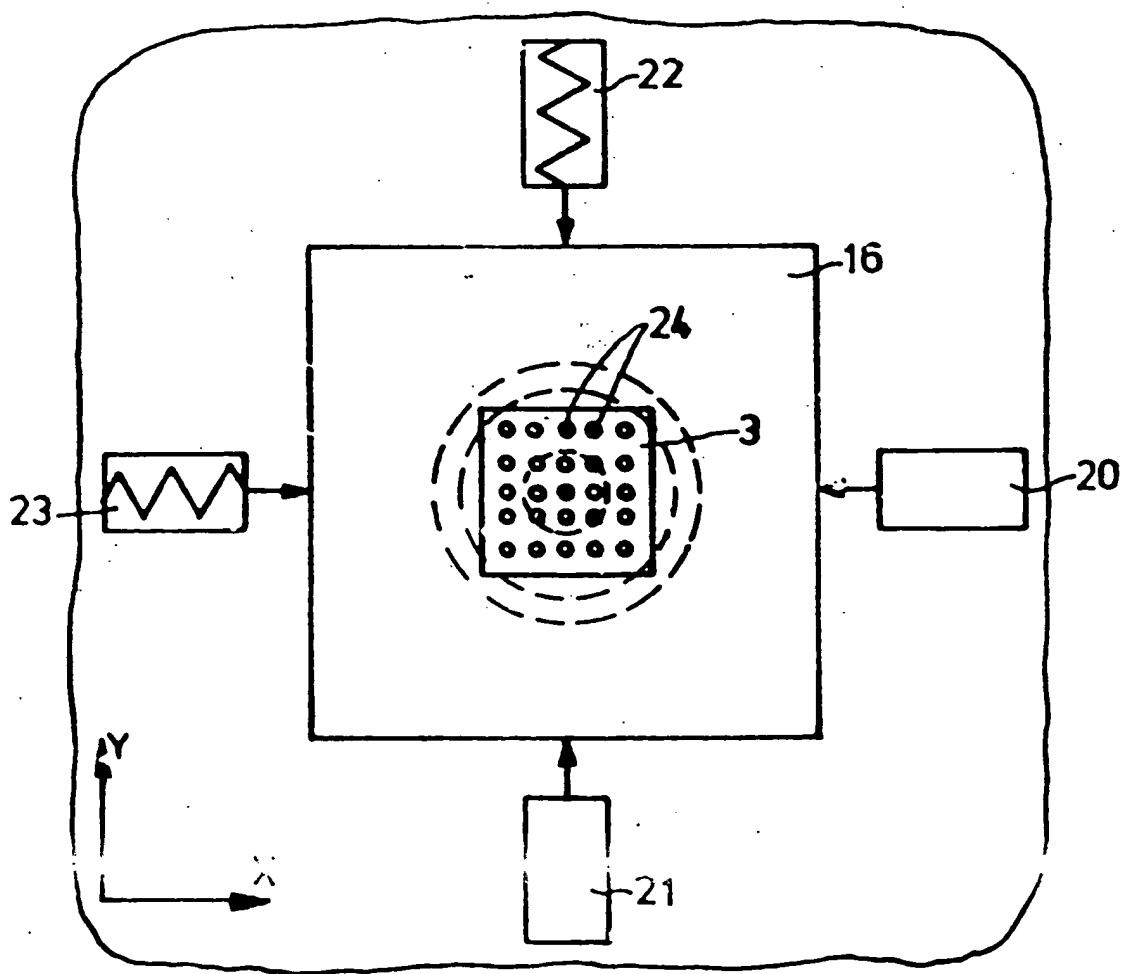


FIG. 6

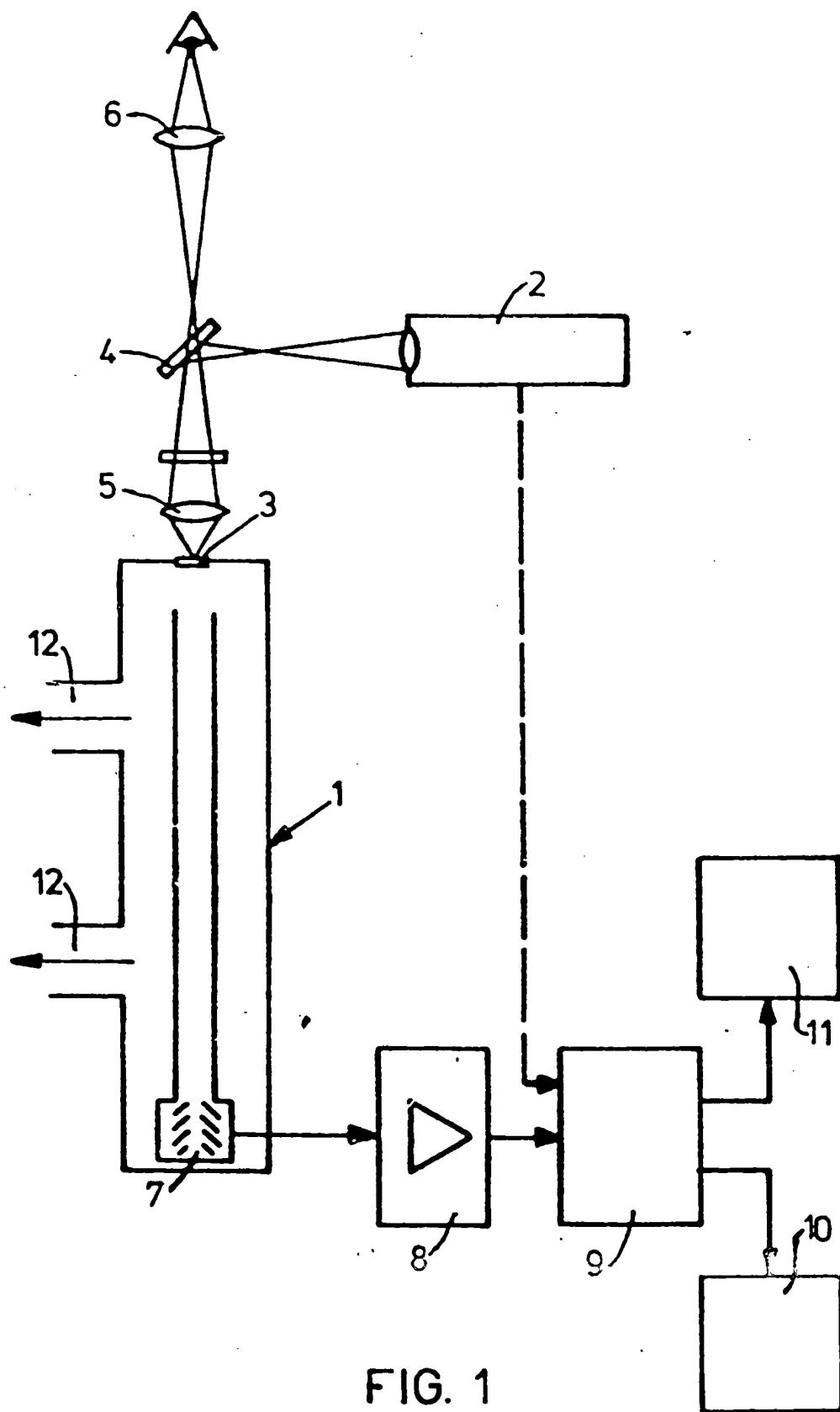


FIG. 1